

# **Physikalische und chemische Strukturänderungen in Purpurmembranvarianten**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Chemie

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

**Ivan Chizhik**

aus Sankt Petersburg

Marburg/Lahn 2013

Vom Fachbereich Chemie

der Philipps-Universität Marburg (Hochschulkennziffer: 1180)

als Dissertation am \_\_\_\_\_ angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. N. Hampp

Zweitgutachter: Prof. Dr. W.-C. Pilgrim

Tag der Disputation: \_\_\_\_\_

Die vorliegende Dissertation wurde in der Zeit von November 2009 bis September 2013 am Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Norbert Hampp angefertigt.

## **E r k l ä r u n g**

gemäß § 10, Abs. 1 der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fachbereiche und des Medizinischen Fachbereichs für seine mathematisch-naturwissenschaftlichen Fächer der Philipps-Universität Marburg vom 28.4.2010

Ich versichere, dass ich meine Dissertation „Physikalische und chemische Strukturänderungen in Purpormembranvarianten“ selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient, sowie alle vollständig oder sinngemäß übernommenen Zitate als solche gekennzeichnet habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den \_\_\_\_\_ 2013

\_\_\_\_\_  
Ivan Chizhik

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits publiziert:

Daniel Rhinow, Ivan Chizhik, Roelf-Peter Baumann, Frank Noll, Norbert Hampp, Crystallinity of Purple Membranes Comprising the Chloride-Pumping Bacteriorhodopsin Variant D85T and Its Modulation by pH and Salinity, *J. Phys. Chem. B*, **2010**, 114 (46), 15424–15428.

Daniel Rhinow, Martin Imhof, Ivan Chizhik, Roelf-Peter Baumann, Norbert Hampp, Structural Changes In Bacteriorhodopsin Caused by Two-Photon-Induced Photobleaching, *J. Phys. Chem. B*, **2012**, 116 (25), 7455–7462.

Martin Imhof, Jens Pudewills, Daniel Rhinow, Ivan Chizik, Norbert Hampp, Stability of Purple Membranes from Halobacterium Salinarum towards Surfactants – Inkjet Printing of a Retinal Protein, *J. Phys. Chem. B*, **2012**, 116 (32), 9727–9731.

Ivan Chizhik, Frank Noll, Norbert Hampp, Self assembly of purple membranes upon water removal analyzed *in-situ*, in Vorbereitung.

## Summary

In this work, a process of self-organization of PM during drying to films was observed. It has been found that from a periodicity of about 59 Å a stable lamellar structure with perpendicular to the film surface oriented PM occurs, corresponding to four layers of water molecules between the membranes. In addition, a scattering isotropy occurs during rotation of the sample in the experiment SAXS about an axis perpendicular to the film surface. It can be suggested that PM in the film have a short-range and no long-range order.

It can be assumed that these four water layers are 2+2 layers, the first and the second hydration shell of PM. The presented *in situ* experiments show a weak interaction of PM with the second hydration shell. This can be observed in the drying and freeze-drying experiments.

It has been shown that in an aqueous suspension PM outside the immediate water-air interface have chaotic distributions. Inside the interface, the membranes are oriented perpendicular to the water surface because of its hydrophilic and hydrophobic properties. The PM is oriented perpendicular to the air-water interface with their hydrophobic edges. Upon drying the suspension concentrates, the top layer approaches the lower layers and induces the orientation of the next layer. Sedimentation and substrates have no effects on the orientation of the PM during formation of the film from aqueous suspensions, and PM in the films are oriented perpendicular to the film surface in all PM films prepared here.

The regular distribution of PM in PM-glycerol films may be the result of a mutual repulsion of the negatively charged membranes. Thus, two effects can be observed: The formation of the preferred orientation of the membranes with respect to the film surface as well as the formation of a stable lamellar structure, which is the regular distribution of PM in films with glycerol. The stability of the lamellar structure with a periodicity of up to about 200 nm is probably due to the high viscosity of glycerol and therefore the lower mobility of PM in the film. According to the current knowledge, it is astonishing that PM spread in films with glycerol not only to almost single-mode periodicity, but also show a preferred orientation. Similar to the case of pure PM-films, a substrate or sedimentation have no effect on the self-assembly of PM in films with glycerol.

It was shown that drying of aqueous suspensions of PM in the presence of gelatine at a temperature of the starting suspension of 35°C and at a ratio PM to gelatine of 1/1, the membranes in the dried film form a periodic, lamellar structure and have a preferred orientation. An increase in temperature of the starting suspension result in films without a periodic, lamellar structure, but the PM in these films has a preferred orientation in one spatial direction.

In the presence of PVA, the periodicity of the PM of a lamellar structure amounts 47 Å, this is as large as in a film of pure PM, that is, PVA is located outside the PM stacks in the film, while the membranes show a preferred orientation in the film.

In this work, the different distributions of PM in films with direct contact between the membranes (PM-PVA films) or without contact (PM and PM-glycerol-gelatin films) were shown. This is important for the further understanding of the properties of PM-films. PM

formed various lamellar structures during drying with glycerol, gelatin, or PVA, but all films show the same preferred orientation of PM. The self-assembly of PM upon drying was observed in the presence of these substances, without examining the interaction between PM and these substances, which are often used as matrices for PM-films for various applications.

The interaction of PM with a water surface and the interaction between the PM are resulting in the orientation of PM during the drying process, leading to self-assembly of PM. This in turn results in a number of film variants to a monomodal periodicity of PM. These interactions leading to self-assembly are so strong, that they are not affected by the presence of different matrices such as glycerol, gelatin, or PVA in the suspension.

In this work, it was demonstrated how a single-point mutation in the core of BR results in PMs undergoing structural changes from a non crystalline state to a 2D-crystalline state, depending on the physicochemical conditions. In BR variant D85T, the primary proton acceptor aspartic acid 85 is replaced by threonine, the equivalent residue in halorhodopsin, which converts BR into a chloride pump. By means of small-angle X-ray scattering (SAXS), it was demonstrated that PM-D85T, non crystalline under most conditions, is converted to a highly ordered hexagonal 2-D crystalline state as soon as the physicochemical conditions favor chloride binding of BR-D85T, i.e., pH values below pH 6 and high salinity. A model is presented which explains the crystallization tendency of PM-D85T in terms of conformational changes on the level of single BR-D85T molecules.

Upon two-photon absorption of BR photoproducts outside the classical photocycle occur, changes in the hexagonal lattice of PM take place, but the PM as a whole is preserved. So these photophysical and photochemical induced changes can be used, e.g., for data storage.

The present work is not only of theoretical, but also of practical importance. The studies presented here allow the evaluation of the orientation of PM in films and the control of the crystal structure of the membranes at various stages of film production.

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	9
2. Bakteriorhodopsin und Purpurmembran	11
3. Vorbereitung der PM-Filme	16
3.1. Purpurmembranen	16
3.2. PM-Filme	16
3.2.1. Probenträger	17
3.2.2. Filme ohne Substrat	18
3.2.3. Bestimmung des Wassergehalts im Film	19
3.2.4. PM-Filme mit Glycerin, Gelatine oder PVA	20
3.2.5. Experimente <i>in situ</i> . Kontrolle des Phasenzustands einer gefrorenen Probe	21
3.3. Chemikalien	21
4. Methoden	22
4.1. SAXS (Röntgenkleinwinkelstreuung)	22
4.2. SEM (Rasterelektronenmikroskopie)	24
4.3. UV-Vis-Spektroskopie	24
4.4. DSC (differenzielle Scanning-Kalorimetrie)	25
4.5. Laser	25
4.6. Zentrifugation	25
4.7. Wiegen	25
5. Ergebnisse und Diskussion	26
5.1. PM-Filme (qualitative Bestimmung der bevorzugten Orientierung von PM im Film)	26
5.2. Selbstorganisation von PM: Trocknung <i>in situ</i>	32
5.2.1. Lyophilisation <i>in situ</i>	41
5.2.2. SEM-Untersuchung von orientierten getrockneten PM-Filmen	45
5.3. Selbstorganisation von PM in Filmen mit Glycerin, Gelatine oder PVA	51
5.3.1. PM-Filme mit Glycerin	51

5.3.2. PM-Filme mit Gelatine	57
5.3.3. PM-Filme mit PVA	61
5.4. Kristallinität von PM D85T	64
5.5. Der $P_{360}$ -Zustand	72
6. Zusammenfassung	79
7. Literatur	81
8. Danksagung	92



## 1. Einleitung

Die lichtinduzierte Protonenpumpe Bakteriorhodopsin (BR) ist ein Schlüsselprotein der bakteriellen Photosynthese. [1-3] Die Sekundärstruktur von BR weist sieben durch die Zellmembran reichenden  $\alpha$ -Helices aus, die durch weitere Aminosäuren verknüpft sind. BR ist homolog zu anderen mikrobiellen Retinalproteinen.[4-10] In *Halobacterium salinarum* ist BR zu Trimeren angeordnet, welche ihrerseits zusammen nur mit Lipidmolekülen eine zweidimensionale, hexagonale Gitterstruktur ausbilden, die Purpurmembran (PM).

Seit etwa zwei Jahrzehnten werden technische Anwendungen von PM, diskutiert. [11-14] Unter diesen Anwendungen sind beispielsweise die photoelektrischen Eigenschaften sowie die Eigenschaft als lichtgetriebene Protonenpumpe von großem Interesse, jedoch ist dazu die Herstellung einer großen, homogenen Fläche (im Vergleich zur Größe einzelner PM) gleich ausgerichteter PM erforderlich.

Viele technische Anwendungen gewinnen von solchen ausgerichteten Schichten von PM. [15,16] Jede Monoschicht PM erzeugt bei Belichtung eine Photospannung von 250 mV [12,15], d. h., dass ein orientierter Stapel aus 10 Schichten eine Photospannung von 2,5 V liefert. Derzeit sind nur orientierte Monoschichten von PM untersucht worden. [17,18]

Die Selbstorganisation von PM in Filmen und in Nanokompositen ist ein bekanntes Phänomen. [19,20,26,27] Diese Filme wurden mittels verschiedener Verfahren hergestellt: Schicht-für-Schicht-Sedimentation [21,22], nach Langmuir-Blodgett [23], durch elektrophoretische Abscheidung [24,25], durch Antigen-Antikörper-Erkennung [17] oder durch Einführung von Nanopartikeln in einen PM-Film [28]. In diesen Filmen sind PM entweder nicht vollständig ausgerichtet, wie es wünschenswert für technische Anwendungen ist, oder die Verfahren sind zeitlich sehr aufwändig und teuer. Auch die Mechanismen der Filmbildung sind noch nicht ganz verstanden. Es besteht daher ein großes Interesse am Verständnis der Prozesse bei Bildung lamellarer Strukturen von PM für die Anwendungen in den Sicherheitssystemen und für die Datenspeicherung. Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher Filme mit und ohne Substrat hergestellt, um zu zeigen, wie die Wechselwirkung von PM mit der Wasseroberfläche und die Wechselwirkung zwischen den PM, die zu der Orientierung von PM bei der Trocknung führt, zur Selbstorganisation der PM führt. Außerdem wurden die Filme mit und ohne Matrices untersucht, um die Selbstorganisationseffekte besser zu verstehen und die Einflüsse der Parameter, wie z.B. die Konzentration des Matrixstoffes und des Wassergehalts, auf Selbstorganisation wurden qualitativ und quantitativ untersucht.

BR weist einen hohen molaren Extinktionskoeffizienten auf. Daher wurden in letzter Zeit viele Untersuchungen bei Belichtung mit niedrigen Lichtintensitäten durchgeführt. [29-36] Zudem weist BR einen extrem hohen Zweiphotonenquerschnitt [11] auf, das erlaubt, Zweiphotonenabsorptionsprozesse bei höheren Strahlungsintensitäten durchzuführen. Bei der Zweiphotonenabsorption von BR entstehen Photoprodukte außerhalb des klassischen Photozyklus, dabei finden molekulare und supramolekulare Veränderungen von PM statt, aber die PM als Ganzes bleibt erhalten. Deswegen kann man diese photophysikalisch und photochemisch induzierten Veränderungen z. B. für irreversible optische Datenspeicherung

verwenden. [37-40] Die Kinetik der Zweiphotonenreaktionen von PM wurde in [37,41] dargestellt.

Hochauflösende Strukturanalysen von BR haben ein detailliertes molekulares Bild des lichtabhängigen vektoriellen Protonentransports durch die Zellmembran enthüllt. [43-48] Darüber hinaus ist PM ein ausgezeichnetes Modell für die Untersuchung der physikalischen und chemischen Einflüsse auf die Struktur des integralen Membranproteinkomplexes in seiner natürlichen Umgebung.[42] Eine Vielzahl der Untersuchungen wurde durchgeführt, um die molekularen Einflüsse auf die Stabilität und die Kristallinität von PM zu klären. Die Analyse von genetisch modifizierten BR-Varianten hat zum Beispiel einige Aminosäurereste aufgedeckt, die für die Ordnung des Gitters entscheidend sind. [42, 49] Weiterhin hat sich gezeigt, dass eine Mutation im Inneren von BR die Anordnung im PM-Kristall stark beeinflussen kann. [50] Für Retinal, das kovalent an Lysin-216 gebunden ist, wurde die Bedeutung der strukturellen Integrität des BR und des Gitters von PM in einer anderen Studie festgestellt. [51] In dieser Arbeit wird gezeigt, wie eine einzelne Punktmutation im Inneren von BR die 2D-Kristallstruktur von PM in Abhängigkeit von physikalisch-chemischen Bedingungen beeinflusst.

## 2. Bakteriorhodopsin und Purpurmembran

Bakteriorhodopsin ist ein Retinalprotein des Archaeobakteriums *Halobacterium salinarum* [52], das 1971 von Oesterhelt und Stoeckenius entdeckt und charakterisiert wurde. [1] *H. salinarum* ist ein extremophiles Archaeobakterium, das in Salinen und Salzseen mit einer Salzkonzentration von ca. 4 M lebt. [53] Bei einer solchen Salzkonzentration hat der Sauerstoff eine sehr kleine Löslichkeit im Wasser, das führt *H. salinarum* vom oxidativen Metabolismus zum anaeroben photosynthetischen Weg des Stoffwechsels. Bei diesen Lebensbedingungen bildet *H. salinarum* eine sogenannte Purpurmembran (PM), die aus Bakteriorhodopsin und Lipiden bestehen und bis zu 50 % der Zelloberfläche der Zelle bedeckt (Abb. 1).

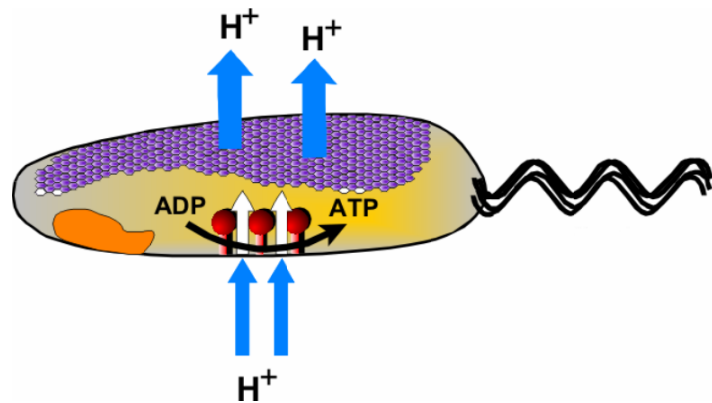


Abb.1: Schematische Darstellung von *Halobacterium salinarum*. [13]

Dieser hydrophobe Retinal-Protein-Komplex Bakteriorhodopsin, der aus 248 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 26784 Dalton und dem Chromophor Retinal besteht, hat in seiner Sekundärstruktur 7  $\alpha$ -Helices (A bis G) und einen  $\beta$ -Faltblattbereich zwischen den Helices B und C auf der extrazellulären Seite (Abb. 2). Das Chromophor Retinal, das an Lysin-216 gebunden ist, besitzt ein Molekulargewicht von 280 Dalton und einen sehr hohen Extinktionskoeffizienten von  $\epsilon_{568} = 63,000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Das Absorptionsmaximum des freien Retinals liegt bei ca. 380 nm, während das Retinal in BR ein breites Absorptionsband bei 570 nm hat. [54] Dieser so genannte Opsinshift wird mit dem Einfluss der Proteinumgebung und der Bindung des Retinals erklärt.

Das Retinal befindet sich im Inneren der ringförmig angeordneten sieben Helices und ist am Protonentransport durch die Membran von der zytosomatischen zu der extrazellulären Seite bei der Absorption eines Photons beteiligt. Bei der Absorption des Photons findet die reversible Isomerisierung des Retinal statt, das sich innerhalb des Proteins durch drei Tryptophanreste (W86, W182 und W189) stabilisiert. [55,56] Diese Absorption induziert den Übergang des Retinal von all-*trans* in die 13-*cis* Konfiguration (Abb. 3), dabei findet eine Übertragung eines Protons von der Schiff'schen Base zur Asparaginsäure 85 statt. Danach wird die Schiff'sche Base mittels eines Protonen-Donors in Position 96 (Asparaginsäure 96) reprotoniert.

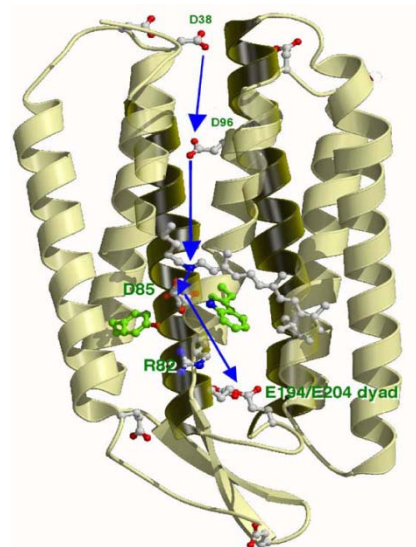


Abb. 2: Schematische Darstellung eines BR-Monomers und des Protonentransportes durch das Bakteriorhodopsin. [13]

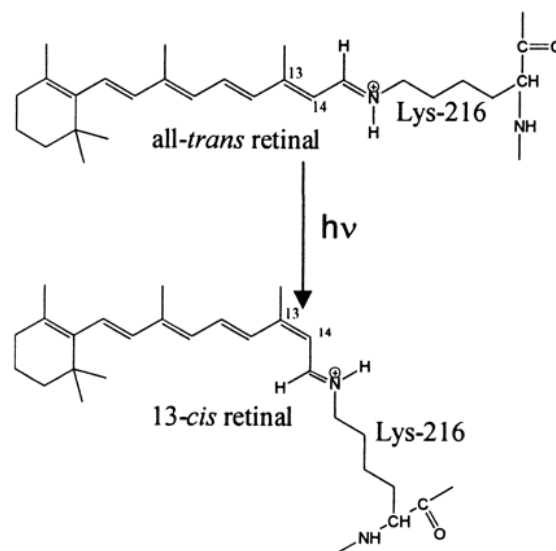


Abb. 3: Schematische Darstellung der photoinduzierten Isomerisierung des Retinals.

Im Dunkeln befindet sich BR im so genannten dunkeladaptierten Zustand. Das ist eine Mischung von 13-cis-Retinal ( $D_{548}$ ) und all-trans-Retinal ( $B_{570}$ ). Das ist ein Anfangszustand von BR im klassischen Photozyklus, der von *Varo* und *Lanyi* beschrieben wurde [57] (Abb. 4). Schematisch kann man diesen Photozyklus in acht Schritten darstellen.

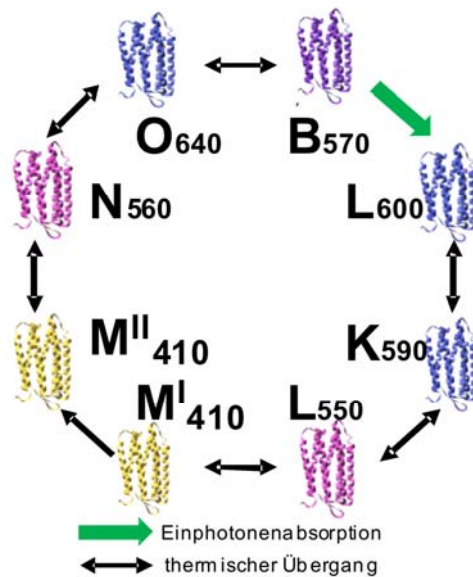


Abb. 4: Schematische Darstellung des Photozyklus‘ von Bakteriorhodopsin. Die Intermediate sind mit Großbuchstaben bezeichnet.

- I:  $\text{B}_{570} \xrightarrow{h\nu} \text{J}_{600}$  Das all-trans Retinal absorbiert ein Photon und verwandelt sich in die 13-cis Konfiguration.
- II.  $\text{J}_{600} \leftrightarrow \text{K}_{590}$  Thermische Relaxation bei einer Raumtemperatur (in ca. 3ps).
- III.  $\text{K}_{590} \leftrightarrow \text{L}_{550}$  Thermische Relaxation bei einer Raumtemperatur (in ca. 1μs).
- IV.  $\text{L}_{550} \leftrightarrow \text{M}_{410}^{\text{I}}$  Ein Übergang des Protons von der Schiffischen Base zu Asparaginsäure 85 findet in Richtung der extrazellulären Seite statt.
- V.  $\text{M}_{410}^{\text{I}} \rightarrow \text{M}_{410}^{\text{II}}$  Dieser Übergang ist der einzige irreversible im BR-Photozyklus. Ein Proton bewegt sich zur extrazellulären Seite, Asp 86 ist protoniert und der pK von Asp 85 vergrößert sich von 3 auf 7.
- VI.  $\text{M}_{410}^{\text{II}} \leftrightarrow \text{N}_{560}$  Die Schiffische Base wird mittels eines Protonen-Donor in der Position 96 (Asparaginsäure 96) reprotoniert.
- VII.  $\text{N}_{560} \leftrightarrow \text{O}_{640}$  Bei der Reprotonierung der Schiffischen Base isomerisiert das Retinal in den all-trans Zustand. Die Asparaginsäure 96 wird von der zytoplasmatischen Seite aus protoniert.
- VIII.  $\text{O}_{640} \leftrightarrow \text{B}_{570}$  Das BR gelangt wieder in den Grundzustand, indem D85 sein Proton abgibt. Die Schiffische Base wird von der extrazellulären Seite zugänglich und das System kann wieder angeregt werden.

Durch Punktmutationen des Bakteriorhodopsins kann man die Eigenschaften sowohl des BR als auch der Purpurmembraan ändern, wie zum Beispiel die Farbe [58-61], die Kristallinität [62] von PM oder die Dauer und den Weg des Photozyklus von BR, sowie seiner

Adhäsionsfähigkeit zu Gold [63]. Der M-Zustand der Mutante D96N hat so beispielsweise eine Lebensdauer von Sekunden statt Millisekunden wie im Wildtyp [64]. Die BR-Mutante D85T kann in Abhängigkeit von den äußeren Bedingungen mehrere Photozyklen haben.[65,66] D85T kann Chlorid-Ionen (wie in Halorhodopsin) auf die zytoplasmatische Seite pumpen oder der Protonentransport von D85T kann in die entgegengesetzte Richtung, also von der extrazellulären zur zytoplasmatischen Seite, verlaufen.

In dieser Arbeit wurden die Eigenschaften der PM-Mutanten D85T, D96N und D96G/F171C/F219L (siehe Abb. 5) und von PM-Wildtyp untersucht sowie die Kristallinität und kollektiven Eigenschaften von PM in Filmen.

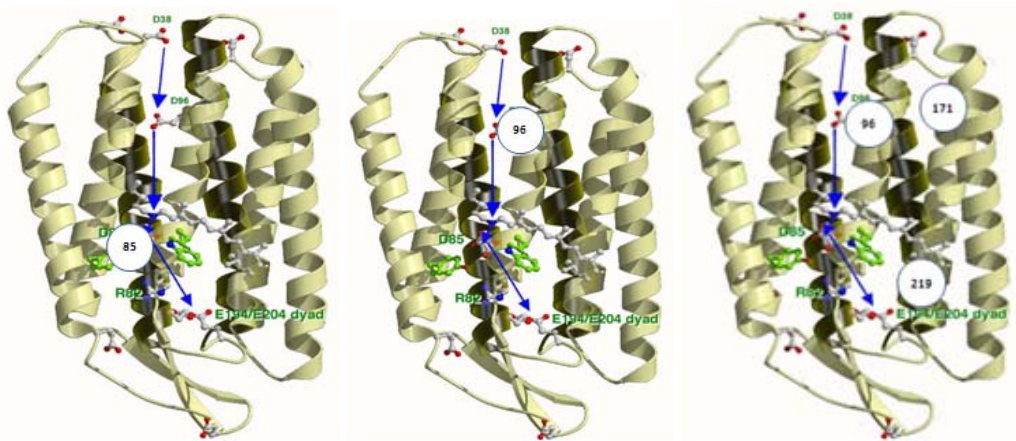


Abb. 5: Schematische Darstellung von BR-Monomeren der Mutanten D85T (links), D96N (mitte) und D96G/F171C/F219L (rechts). Die jeweiligen Mutationspositionen sind angegeben.

Purpurmembran bestehen aus Trimereen von BR, welche ein hexagonales zweidimensionales Kristall (Kristallgruppe P3) ausbilden. (Abb.6) Die Periodizität der Trimere, die mittels der Glycerinethergruppen in der Lipiddoppelschicht stabilisiert sind [67], beträgt 62 Å. In PM ist BR das einzige Protein, das sich in der Lipiddoppelschicht befindet. Das Verhältnis Lipid/Protein beträgt 1/3 (m/m), das entspricht ungefähr 10 Lipidmolekülen pro BR. PM besitzt eine Dichte von 1,18 g/cm<sup>3</sup>. [13] Die BR-Moleküle sind in der Lipiddoppelschicht so orientiert, dass sich das C-terminale Ende der Aminosäurekette auf der cytoplasmatischen Seite und das N-terminale Ende auf der extrazellulären Seite befinden. [68-70]

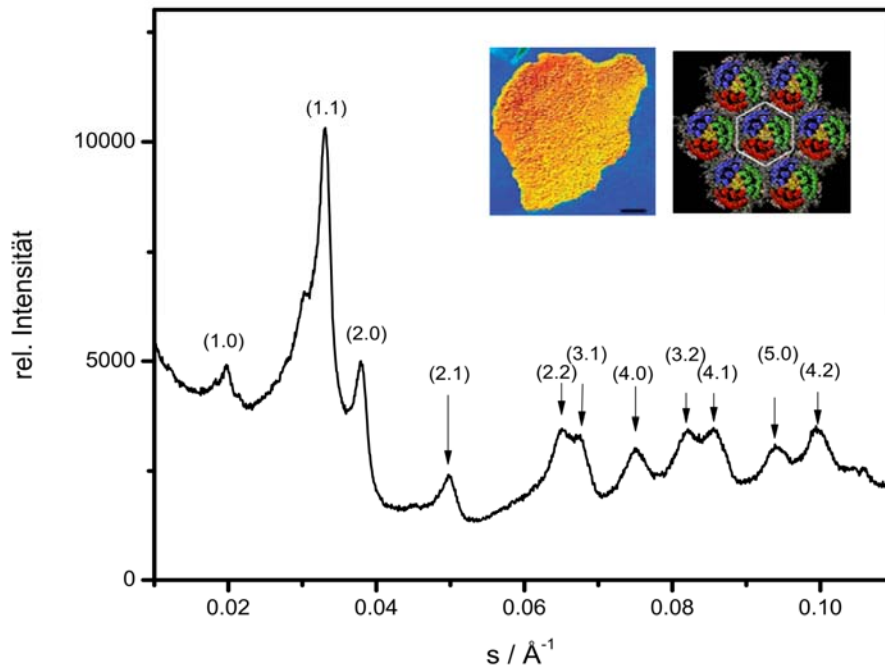


Abb. 6: SAXS-Streuprofile eines getrockneten PM-Films mit Indizierung der durch die kristalline Struktur hervorgerufenen Signale. Eingefügt in das Diagramm sind eine TEM-Aufnahme einer PM (links) und eine schematische Darstellung des hexagonalen Gitters (rechts).

Wegen seiner einzigartigen physikalischen und chemischen Eigenschaften wie die hohe Temperaturstabilität (bis 80°C in Wasser und bis 140°C im getrockneten Zustand) [71], Stabilität gegenüber Lösungsmitteln [72], hohe Salzkonzentration und pH-Wert (von 0 bis 12) [73], wurde PM schon seit Anfang der 1970er Jahre untersucht.

Die Struktur von PM wurde 1975 von R. Henderson und P. N. T. Unwin mittels Elektronenbeugung gezeigt [69], und die Dicke der Membran mit Hilfe von SAXS bestimmt. [74] Weitere Strukturuntersuchungen haben nicht nur die Ergebnisse präzisiert, sondern auch zur weiteren Aufklärung des Protonenwegs geführt. [43-46,75] Auch die Struktur von PM-Filmen wurde schon in der Vergangenheit untersucht. [76]



### 3. Vorbereitung der PM-Filme

#### 3.1. Purpurmembranen

PM-Suspensionen wurden nach Standardprozeduren hergestellt, gereinigt und lyophilisiert. [77] In dieser Arbeit wurden Wildtyp-Purpurmembranen sowie die Mutanten D96N und D85T, die Doppelmutante D85T-D96N, die Dreifachmutante D96G/F171C/F219L (Trimutante) verwendet.

Eine wässrige Suspension aus lyophilisierter PM wurde durch Mischen des Feststoffes mit Wasser hergestellt. Wenn notwendig wurde die native oder bestrahlte PM-Suspension durch Zentrifugation aufkonzentriert. Der Prozess der Zentrifugation zeigte keine Wirkung auf die Struktur von PM.

Es ist bekannt, dass die Größe der nativen Purpurmembranen im Bereich  $0,2 - 2 \mu\text{m}$  liegt. Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete technische gefriergetrocknete Material hat hauptsächlich eine Größe von  $50 - 400 \text{ nm}$ . Das ist in Abb. 7 zu sehen. Natürlich haben die SEM-Daten keine statistische Aussagekraft, aber diese Daten können als eine Einschätzung benutzt werden.

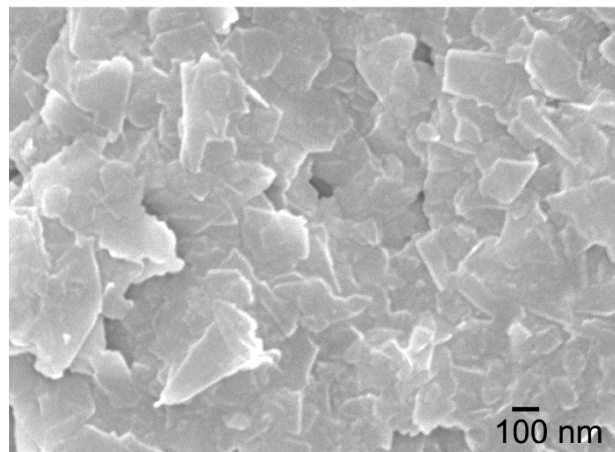


Abb. 7: SEM-Aufnahme einer getrockneten PM-Suspension.

#### 3.2. PM-Filme

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Eigenschaften dünner Filme und die Selbstorganisation von PM in dünnen Filmen bei Trocknung untersucht, deswegen müssen zuerst Begriffe wie „der Film“ und „der dünne Film“ definiert werden. Eine Probe wird „der Film“ genannt, wenn das Verhältnis Breite/Dicke mehr als 100 beträgt. Unter dem Begriff „der dünne Film“ sind Filme mit einer Dicke von  $0,4$  bis  $100 \mu\text{m}$  zu verstehen.



### 3.2.1. Probenträger

Für die Herstellung reproduzierbarer Filme wurde ein Probeträger entwickelt (Abb. 8). Dieser Probeträger besteht aus einer Metallscheibe aus Messing mit einem daran fest klebenden dünnen Polyethylenterephthalat-Film (PET-Film). Der Innendurchmesser der Scheibe beträgt 13 mm, was der geometrischen Form und den Größen des Röntgenstrahls und dem Kamera-Gehäuse angepasst ist.

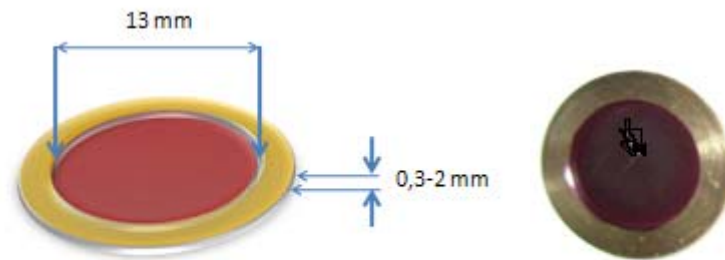


Abb. 8: Schematische Darstellung eines Probeträgers (links) und ein Foto eines PM-Films in einem Probeträger (rechts).

Die Dicke der Scheiben beträgt 0,3 – 2 mm. Sie erlaubt, die PM-Filme mit verschiedenen vorgegebenen Dicken und mit guter Reproduzierbarkeit der Filmdicke zu erhalten. Ein Film hat in einem solchen Probeträger eine flache Form, dies erlaubt, die anisotropen Eigenschaften bei unterschiedlichen Einfallswinkeln des Röntgenstrahls zu untersuchen.

Die Filme wurden durch folgende Verfahren hergestellt: im ersten Verfahren wird die nötige Menge der mit der vorgegebenen Konzentration hergestellten PM-Suspension auf den PET-Film im Probenhalter getropft und trocknet dann unter Raumbedingungen für nicht weniger als 10 Stunden (Abb. 9a). Für die Herstellung der Filme wurde eine PM-Suspension mit einer Konzentration von 0,1 – 10 % verwendet. Infolgedessen wurden gleichmäßige Filme erhalten, die das Verhältnis Breite/Dicke im Bereich von 100 bis 30000 haben. Typische Filme mit Dicken zwischen 5 und 100  $\mu\text{m}$  wurden auf hydrophoben PET-Substraten erhalten, während auf hydrophilisierten PET-Filmen sehr dünne Filme (0,4 – 5  $\mu\text{m}$ ) hergestellt werden konnten.



Abb. 9: (a) Schematische Darstellung der Herstellung eines Films aus einer Suspension im Probeträger. (b) Skizze einer Rakel: (1) Frontansicht, (2) Querschnitt, (3) Schematische Darstellung des Rakelns, überflüssige Suspension wird vor der Rakel weggedrückt, dahinter hat die Suspension eine konstante Höhe. [78]

Bei der zweiten Methode wurde die Schichtdicke durch das Abziehen mittels einer Rakel mit einer definierten Spalthöhe eingestellt. Für eine hohe Oberflächengüte ist es wichtig, dass die Rakel mit gleichmäßiger Geschwindigkeit über das Substrat geführt wird. Dies kann durch einen Filmapplikator gewährleistet werden. Als Rakel werden Metallprofile mit einer Spalthöhe von 0,3 – 2 mm verwendet. In Abb. 9b werden die Form einer Rakel und deren Anwendung gezeigt.

Beide Methoden geben Filme mit gleichen Eigenschaften, dies wurde mittels zahlreicher Experimente festgestellt.

### 3.2.2. Filme ohne Substrat

Außer den Filmen, die auf hydrophilem oder hydrophobem Substrat getrocknet wurden, wurden Filme ohne Substrat hergestellt und untersucht. Die PM-Suspension hängt dabei auf einem Metallrahmen mit Hilfe von Oberflächenspannung (Abb. 10). Das Volumen der PM-Suspension beträgt ca. 20 mm (Länge) mal 4 mm (Breite) mal 1,5 mm (Dicke). Bei Messung unter einem Einfallswinkel von  $90^\circ$ - $90^\circ$  hat die Suspension eine effektive Anfangsdicke von 1,5 mm, und da diese Suspension ohne Substrat im Metallrahmen hängt trocknet sie von beiden Seiten. Im Unterschied zur Trocknung auf einem PET-Film ist hier der Einfluss eines Substrates auf die Geometrie des Filmes von vorneherein ausgeschlossen.

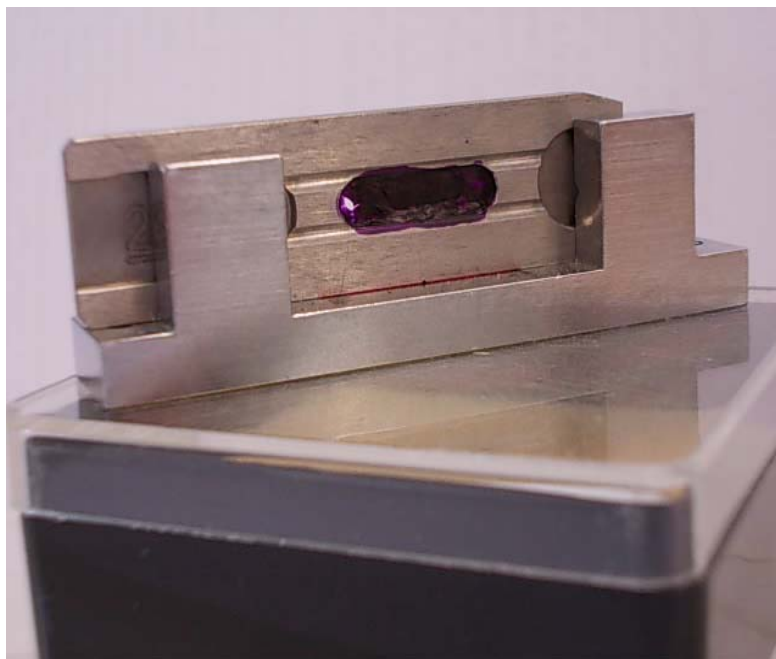


Abb. 10: Metallrahmen mit Suspension.

Im Vergleich mit Filmen, die auf einem Substrat trocknen, beträgt auf diese Weise die effektive, zur Trocknung beitragende Dicke der Filmsuspension 0,75 mm, da hier die Suspension von zwei Seiten aus trocknen kann (Abb. 11). Zudem wurden solche Filme in der horizontalen und vertikalen Lage getrocknet.

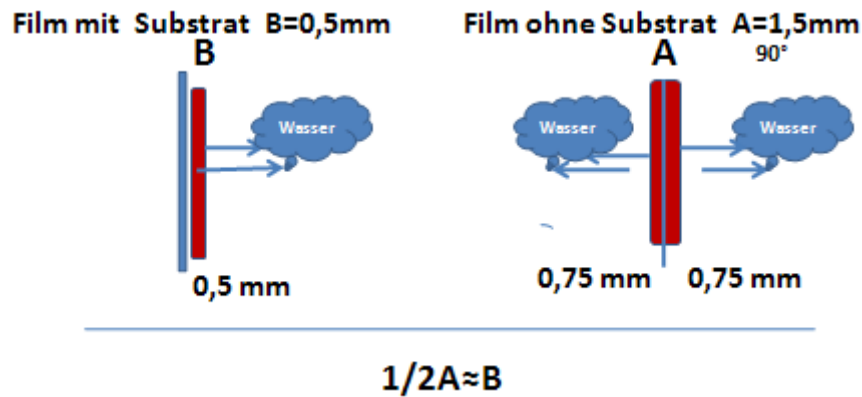


Abb. 11: Schematische Darstellung der effektiven Dicke zweier PM-Filme mit und ohne Substrat.

Für die Herstellung von Filmen ohne Substrat wurden Suspensionen mit unterschiedlichen PM-Konzentrationen zwischen 5 und 12 % verwendet, meistens wurde eine 7%ige wässrige Suspension benutzt. Dies erlaubte, Filme mit einer Dicke von ca. 50  $\mu\text{m}$  (Verhältnis Breite/Dicke  $\sim 100$ ) zu erhalten, folglich entsprechen solche Probe den geometrischen Anforderungen.

### 3.2.3 Bestimmung des Wassergehalts im Film

Die Messung des Wassergehalts im Film wurde durch Wiegen durchgeführt. Zuerst wurde ein vorbereiteter Probenträger mit frisch befestigtem PET-Film gewogen, dann wurde der Probenträger in den Probenhalter der Kratky-Kamera gelegt und zusammen mit diesem ein weiteres Mal gewogen. Danach wurde mittels einer Eppendorf-Pipette die nötige Menge der PM-Suspension der gewünschten Konzentration in den Probeträger getropft und dieser wurde noch einmal gewogen. Die Differenz dieser Gewichte ergibt das genaue Gewicht der Probe.

Anschließend wird eine SAXS-Messung durchgeführt, danach wird der Probeträger erneut gewogen. Aus den gemessenen Gewichten vor und nach einer Messung kann ein mittleres Gewicht der Probe während der SAXS-Messung berechnet werden. So wurde eine Abhängigkeit der Masse der Probe (und entsprechend des Wassergehalts im Film) von der Trocknungszeit bestimmt (Abb. 12). Auf diese Weise können wir mit Hilfe dieser Abhängigkeit einen Wassergehalt im PM-Film zu jeder Zeit unseres Experiments berechnen.

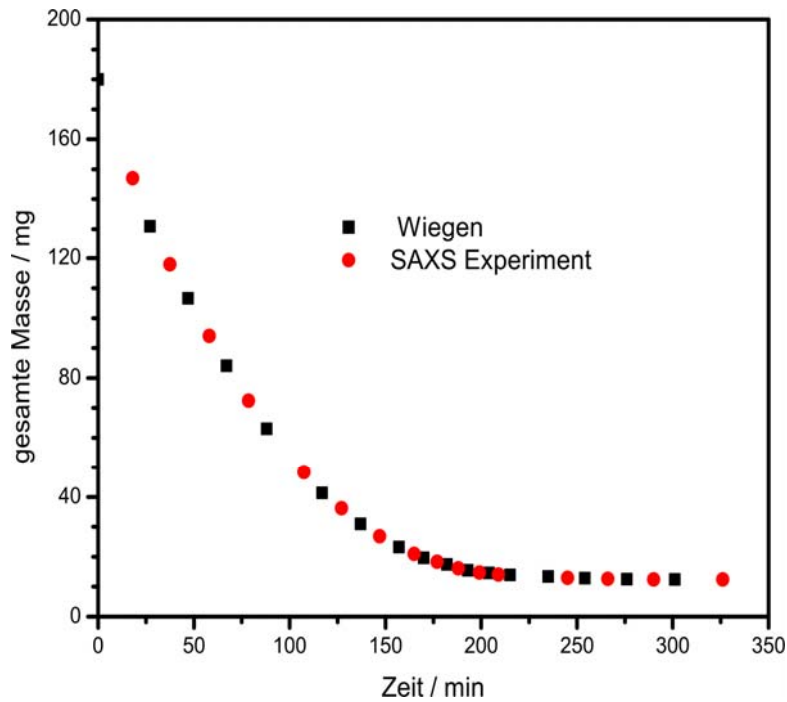


Abb. 12: Abhängigkeit der Masse der Probe von der Trocknungszeit. Die violetten Punkte stellen die Ergebnisse des Wiegens der Probe zwischen den SAXS-Messungen dar. Die schwarzen Quadrate stellen die zu den Messzeitpunkten interpolierten Werte dar.

Die SAXS-Messungen und das Wiegen wurden bis zum konstanten Probengewicht durchgeführt. Danach wurde die trockene Probe noch ein Mal zusammen mit und ohne Probenhalter gewogen. Die benutzte Waage vom Typ Mettler Toledo XS105 Dual Range weist eine Genauigkeit im uns interessierenden Gewichtsbereich des Probenträgers mit Probenhalter von 0,1 mg auf, das ist weniger als 2% des Gewichts des getrockneten Films. Ohne Probenhalter läuft die Waage im zweiten Gewichtsbereich und besitzt eine Genauigkeit von 0,02 mg.

### 3.2.4. PM-Filme mit Glycerin, Gelatine oder PVA

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Methoden der Herstellung von PM-Filmen mit Glycerin, Gelatine oder PVA verwendet. Einerseits wurde die notwendige Menge lyophilisierter PM in die Lösung des Matrixstoffes bei Raumtemperatur (für Glycerin) oder bei 40°C (für Gelatine oder PVA) eingebracht durch Schütteln suspendiert. Bei der zweiten Methode wird schon vorbereitende wässrige PM-Suspension mit der „Matrix-Lösung“ vermischt. Wie SAXS-Untersuchungen an PM-Filmen zeigten ist eine höhere Temperatur von 40°C oder die Einwirkung von Ultraschall zur homogenen Verteilung von PM in den Suspensionen nicht notwendig.

### 3.2.5. Experimente *in situ*. Kontrolle des Phasenzustands einer gefrorenen Probe

Zwei Tropfen (einer PM-Suspension und von Wasser) wurden auf einem Probenhalter zusammen mit einer Probe eingefroren. Während des Experiments können diese Tropfen visuell beobachtet werden, dies erlaubt, den Phasenzustand der Probe zu kontrollieren, da beide gefrorenen Proben sich unter den gleichen physikalischen Bedingungen befinden.

### 3.3. Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen *Gelita*, *Fluka* (Buchs, Schweiz) und *Sigma-Aldrich* (Steinheim, Deutschland) bezogen.

Entionisiertes Wasser wurde der universitären Anlage TKA Pacific (Leitfähigkeit ca. 7  $\mu\text{S}$ ) und TKA-MICRO (Leitfähigkeit ca. 0,07  $\mu\text{S}$ ), (TKA Wasseraufbereitungssystem GmbH, Deutschland) entnommen.

## 4. Methoden

### 4.1. SAXS (Röntgenkleinwinkelstreuung)

Die SAXS-Messungen wurden mit einer Kompakt-Kratky-Kamera (Abb. 13) (Anton Paar, Graz, Österreich) im Bereich von  $3 \times 10^{-3}$  bis  $1,5 \times 10^{-1}$  rad durchgeführt. Der kleinste vermessbare Winkel beträgt für dieses Gerät  $3 \times 10^{-3}$  rad, das entspricht dem Braggschen Wert von  $500 \text{ \AA}$ .

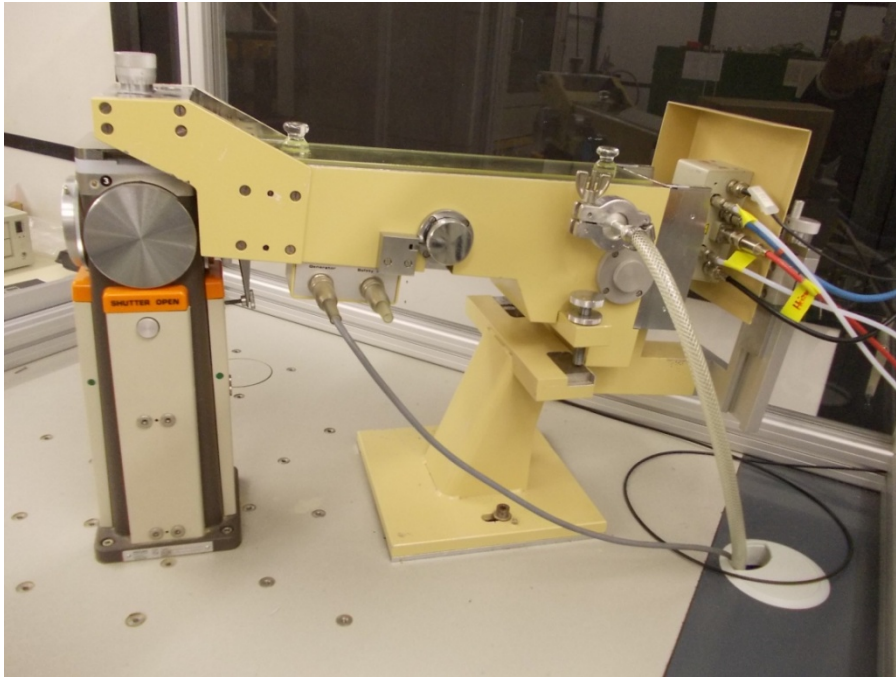


Abb. 13: Kompakt-Kratky-Kamera

Das Kamera-Gehäuse weist Berylliumfenster auf und bildet einen dichten evakuierten Raum. Der Abstand zwischen Präparatachse und Zählrohrspalt beträgt 200 mm. Alle Messungen wurden bei einem Eintrittspalt von  $80 \text{ }\mu\text{m}$  durchgeführt, dies entspricht einer realen Auflösung von  $D_{\text{real}} = 930 \text{ \AA}$ .

Der verwendete Röntgengenerator PW1830 (Philips, Deutschland) ist mit einer Cu-Röntgenröhre mit  $K_{\alpha}$ - ( $1,54 \text{ \AA}$ ) und  $K_{\beta}$ -Linien ausgestattet. Für die Monochromatisierung der Kupferstrahlung wurde eine  $10 \text{ }\mu\text{m}$  dicke Nickelfolie verwendet, welche die  $K_{\beta}$ -Linie auf das 0,0865fache, die  $K_{\alpha}$ -Linie aber nur auf das 0,6658fache abschwächt. Die verbleibende  $K_{\beta}$ -Intensität kann also vernachlässigt werden. Die SAXS-Messungen wurden bei einer Beschleunigungsspannung der Röntgenröhre von  $U=40 \text{ kV}$  und einem Strom von  $I=25 \text{ mA}$  durchgeführt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Kratky-Kameras mit verschiedenen Detektoren verwendet. Eine Kratky-Kamera mit einem ortempfindlichen Detektor erlaubt, den ganzen Messbereich gleichzeitig zu messen, das ist ein großer Vorteil für die Untersuchung schwach streuender Proben. Konstruktionsbedingt kann mit diesem Aufbau aber erst ab einem Streuvektor von etwa  $s = 0,01 \text{ \AA}^{-1}$  gemessen werden. Die zweite Kamera ist mit einem

Goniometer und einem Zählrohr ausgestattet. Bei der Verwendung des Zählrohrs wird die Streukurve punktwiese mit Hilfe eines Zählrohrspaltes und mitgeführtem Zählrohr abgetastet. Alle Messungen wurden im Transmissionsregime durchgeführt.

Für die Untersuchung der orientierten Filme bei unterschiedlichen Winkeln wurde ein Probenhalter angefertigt. (Abb. 14) Diese Vorrichtung hat erlaubt, eine Probe bei einem Winkel von  $90^\circ$  bis  $10^\circ$  zu messen.

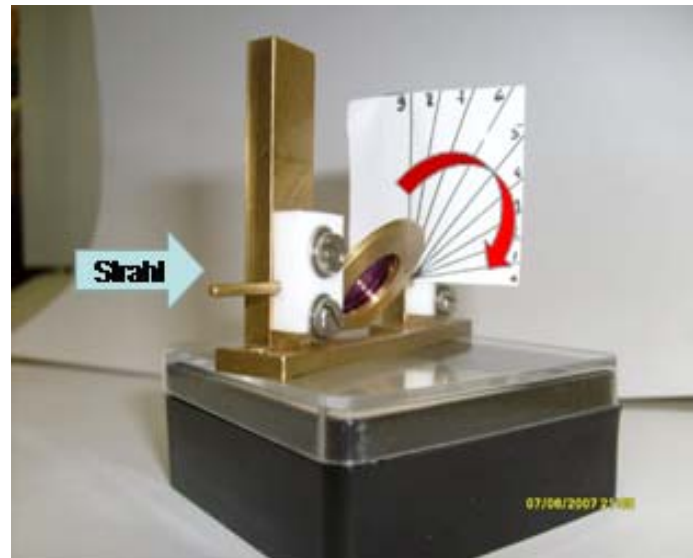


Abb. 14: Probenhalter zur Messung bei unterschiedlichen Einfallswinkeln.

Meistens wurden die Messungen bis zu einem Winkel von  $20^\circ$  wegen der großen Abweichung der effektiven Dicke  $D$  des Films bei größeren Winkeln durchgeführt. Die Genauigkeit der Einstellung des Winkels war nicht schlechter als  $\pm 2^\circ$ , deswegen beträgt die Abweichung der effektiven Dicke eines Films bei einem Winkel  $20^\circ$  weniger als 10%, bei  $10^\circ$  aber schon fast 20%. Ein Schema zur Berechnung der effektiven Dicke  $D$  eines Films ist in Abb.15 dargestellt.

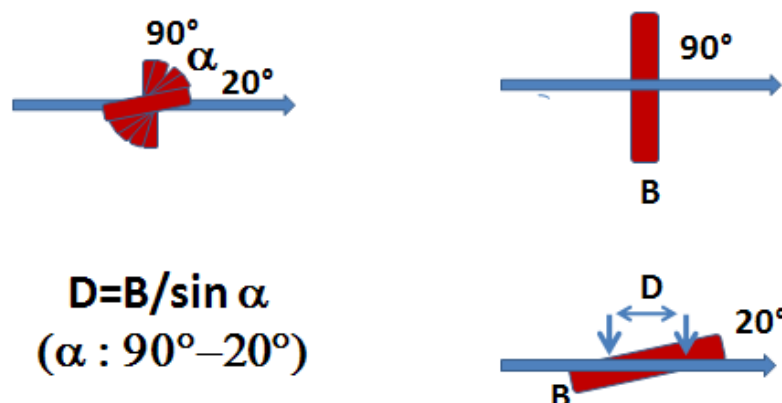


Abb. 15: Schematische Darstellung der effektiven Dicke eines Films.

Für die Untersuchung der Selbstorganisation von PM bei Trocknung einer wässrigen Suspension wurden die Proben zumeist bei drei unterschiedlichen Einfallswinkeln (Abb.16) gemes-



sen. Das erlaubt, ein dreidimensionales Bild der bei Trocknung ablaufenden Prozesse im Film zu bekommen.

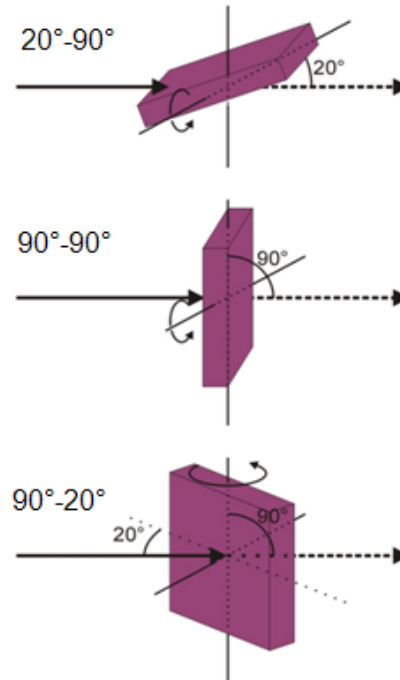


Abb. 16: Skizze der Orientierung einer Probe in der Kratky-Kamera.

#### 4.2. SEM (Rasterelektronenmikroskopie)

SEM-Aufnahmen wurden mittels eines Rasterelektronenmikroskops vom Typ Jeol JSM-7500F (Jeol, Japan) aufgenommen. Die Beschleunigungsspannung der Elektronenquelle lag dabei zumeist zwischen 1 und 5 kV, gemessen wurde bei Raumtemperatur. Vor den Messungen wurden die Proben im Mikroskop mit einer dünnen Schicht aus Platin besputtert (Sputterbedingungen: Strom 10 mA, Dauer 60-120 s).

#### 4.3. UV-Vis-Spektroskopie

Absorptionsspektroskopie im UV-Vis-Bereich wurde für die Abschätzung der PM-Konzentration in Suspensionen und die Bestimmung der Dicke von PM-Filmen verwendet, um die Parameter bei der Herstellung der Proben zu optimieren. Außerdem wurde diese Methode für die Identifizierung von Photointermediaten des BRs bei Bestrahlung der Probe und Bestimmung der Absorptionsmaxima bei physikalischen, chemischen und photochemischen Strukturänderungen von PM ausgenutzt. Die Absorptionsspektren wurden mittels eines Zwei-strahl-Spektrometers vom Typ Lambda 35 (Perkin Elmer, USA) aufgenommen.



#### **4.4. DSC (differenzielle Scanning-Kalorimetrie)**

Die Temperaturabhängigkeit der Wärmekapazität von gefriergetrockneten Purpurmembranen wurde mit Hilfe der Differential Scanning Calorimetry-Methode (DSC) gemessen. Die Messungen wurden im Temperaturbereich von 20-120°C mit einer Erwärmungsgeschwindigkeit von 1°C/min im DSC1 STAR System (Mettler, Gießen, Deutschland) durchgeführt.

#### **4.5. Laser**

PM-Wildtyp wurde in Suspension in Quarzküvetten oder im Film mit frequenzverdoppeltem Licht eines Nd:YAG-Lasers (Infinity 40-100, Coherent Inc.) bei 532 nm (Pulsdauer 3 ns, Wiederholrate 20 Hz) bestrahlt.

#### **4.6. Zentrifugation**

Die Reinigung und Aufkonzentrierung von PM wurde mit Hilfe einer Zentrifuge Typ Sorvall Super T21 (Kendro Laboratory Products, USA) und einer Zentrifuge Typ Biofuge 13 (Heraeus Instruments, Marburg, Deutschland) durchgeführt.

#### **4.7. Wiegen**

Die Messungen der Feuchtigkeit der Proben wurden mittels Wiegen mit einer Analysenwaage Typ Mettler Toledo XS105 Dual Range (Mettler, Gießen, Deutschland) durchgeführt. Die Genauigkeit des Wiegens im hier interessierenden Bereich ist nicht größer als 0,1 mg, das ist weniger als 2% des Gewichts des getrockneten Films.

## 5. Ergebnisse und Diskussion

### 5.1. PM-Filme (qualitative Bestimmung der bevorzugten Orientierung von PM im Film)

In Abb. 17 sind die unter verschiedenen Einfallswinkeln gemessenen Streukurven eines Films, getrocknet aus wässriger Suspension, dargestellt. Bei einem Winkel von  $90^\circ$  (der Strahl steht senkrecht zur Filmoberfläche, Winkel  $90^\circ$ - $90^\circ$ , siehe Abb. 16) entspricht die Streukurve der des bekannten hexagonalen Gitters. Alle Reflexe (Bragg-Peaks) kann man identifizieren und den Peak mit der größten Intensität bei  $s = 0,032 \text{ \AA}^{-1}$  als (1;1) indizieren.

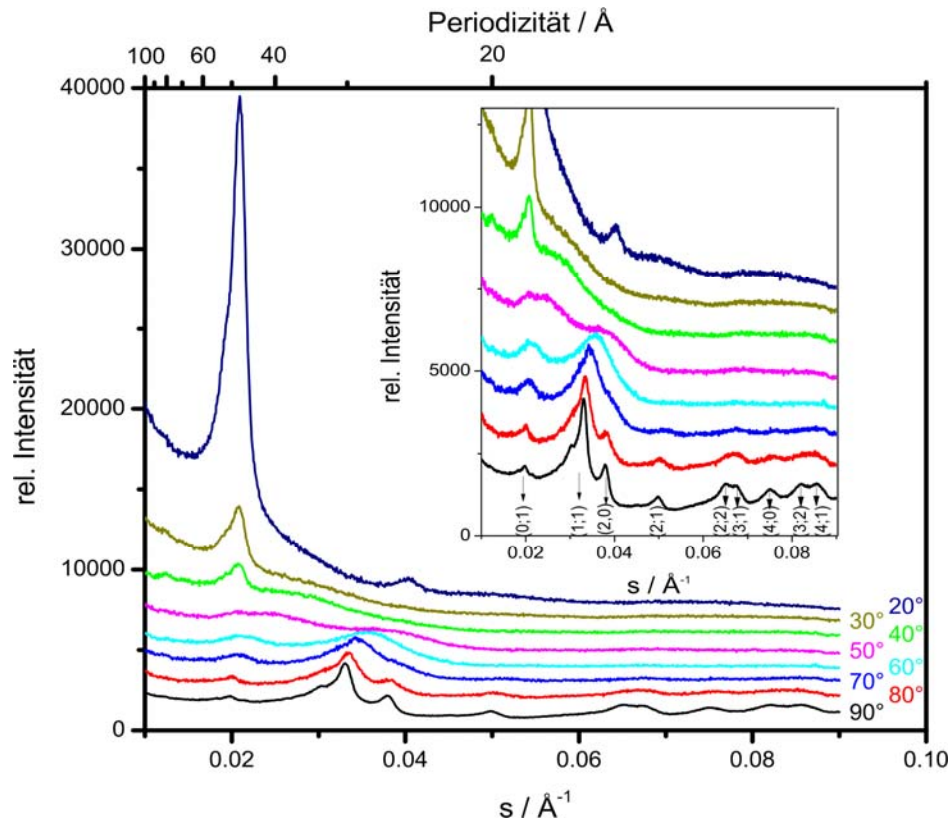


Abb. 17: SAXS-Streukurven eines orientierten getrockneten PM-WT-Films bei unterschiedlichem Einfallswinkel. Eingefügt in das Diagramm sind die Streukurven in einer anderen Vergrößerung, die Peaks sind indiziert.

Bei der Verkleinerung des Einfallswinkels verschwindet die Streukurve des hexagonalen Gitters von PM, und bei einem Winkel von  $40^\circ$  entsteht ein Peak bei einem Streuvektor  $s$  von ca.  $0,02 \text{ \AA}^{-1}$ , der das Vorhandensein der lamellaren Struktur zeigt. Die Abhängigkeit des Streubildes vom Winkel ist ein Kennzeichen für die anisotrope Anordnung von PM im Film. Im Fall der Messung an PM-Pulver hängt das Streubild nicht vom Einfallswinkel ab. Die Periodizität der lamellaren Struktur ( $47 \text{ \AA}$ ) wird aus der Position des Peaks berechnet und entspricht der Dicke einer PM. [79] SEM-Aufnahme eines orientierten getrockneten PM-WT-Films ist in Abb. 18 dargestellt.

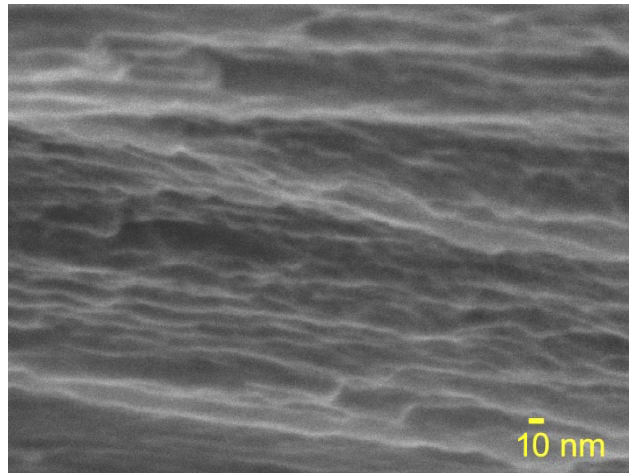


Abb. 18: SEM-Aufnahme der Bruchkante eines orientierten getrockneten PM-WT-Films.

Auf diese Weise kann man bei der Drehung des PM-Films um die horizontale Achse (Abb. 16) eine Anisotropie des Films zeigen.

Für einen lyophilisierten Film wird ein anderes Bild der Streuung erhalten (Abb. 19). Die Streukurven zeigen gleichzeitig die Peaks beider Strukturen: lamellare ( $s \approx 0,02 \text{ \AA}^{-1}$ ) und hexagonale Strukturen (Reflex (1;1),  $s = 0,032 \text{ \AA}^{-1}$ ). Entsprechende Untersuchungen an PM-Pulver zeigen qualitativ die gleichen Ergebnisse.

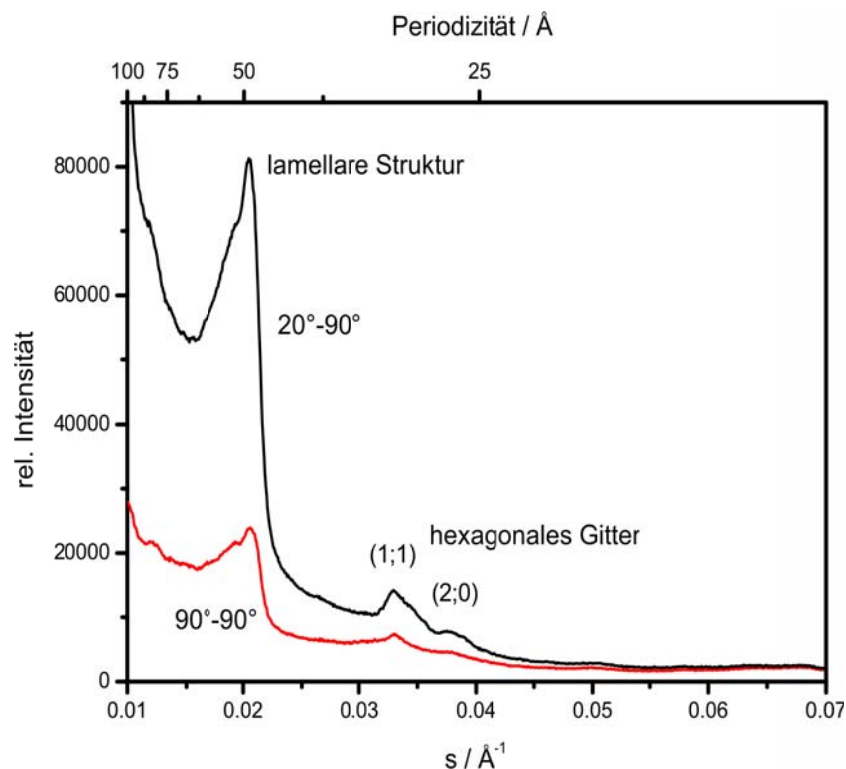


Abb. 19: SAXS-Streukurven eines lyophilisierten PM-WT-Films, gemessen bei zwei Einfallswinkeln:  $90^\circ$ - $90^\circ$  (rot) und  $20^\circ$ - $90^\circ$  (schwarz).

Außerdem hängt die Streuung vom Einfallswinkel nicht ab. Folglich zeigt die Drehung des Films um die horizontale Achse die isotrope Struktur der Probe. Es wird nur eine Vergrößerung der Intensität wegen der Änderung der effektiven Dicke des Films beobachtet (siehe

Kap. 4.1). Dieses Streubild wird durch Daten vom SEM (Abb. 20) erklärt, denn der lyophilisierte Film weist große Poren auf, wodurch die Streuintensität bei kleinen Werten des Streuvektors  $s$  stark zunimmt. Zudem zeigt die SEM-Aufnahme, dass PM im Film keine orientierten Stapel ausbildet, wodurch im Streubild die hexagonaler und die lamellarer Struktur gleichzeitig für Signale sorgen.

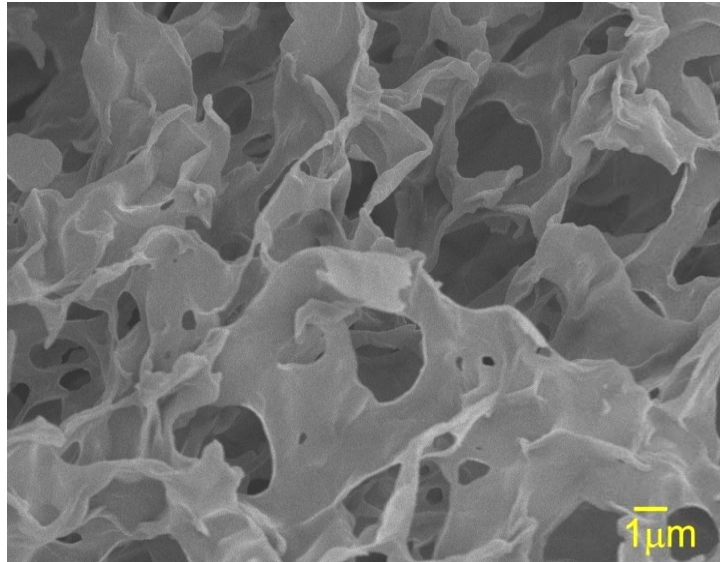


Abb. 20: SEM-Aufnahme der Bruchkante getrockneter lyophilisierter PM-WT.

Auf diese Weise kann man bei der Drehung der Probe um die horizontale Achse eine Isotropie des Films zeigen.

Mit Hilfe der SAXS kann der Grad der Orientierung von PM in den Filmen beschrieben werden. Dafür wird die Abhängigkeit der normierten Intensität des Peaks der lamellaren Struktur vom Drehwinkel für verschiedene Proben aufgetragen. In Abb.21 sind die Abhängigkeiten für einen orientierten getrockneten Film und einen lyophilisierten Film von PM-WT und für die Mutante D85T dargestellt. Der Verlauf dieser Abhängigkeiten zeigt die unterschiedlichen Orientierungen und die verschiedene geometrische Form von PM in den Filmen. Flache und sehr gut orientierte Membranen geben eine antiproportionale Abhängigkeit (schwarz), unorientierte Stapel von PM zeigen hingegen eine Gerade (rot), die parallel zur x-Achse läuft. Die Intensitätsabhängigkeit eines D85T-Films nimmt einen Zwischenzustand ein, d. h. sie zeigt das Vorhandensein einer Orientierung. In Abb. 22 ist die SEM-Aufnahme eines aus einer Puffer-Suspension (pH 7,8) hergestellten, getrockneten D85T-PM-Films dargestellt. In dieser Abbildung sieht man deutlich eine gekrümmte Form der Membranen, aber es ist sehr schwierig, ihre Orientierung einzuschätzen, weil die SEM-Methode keine statistische Aussage über die Form und die Orientierung der Membranen gibt.

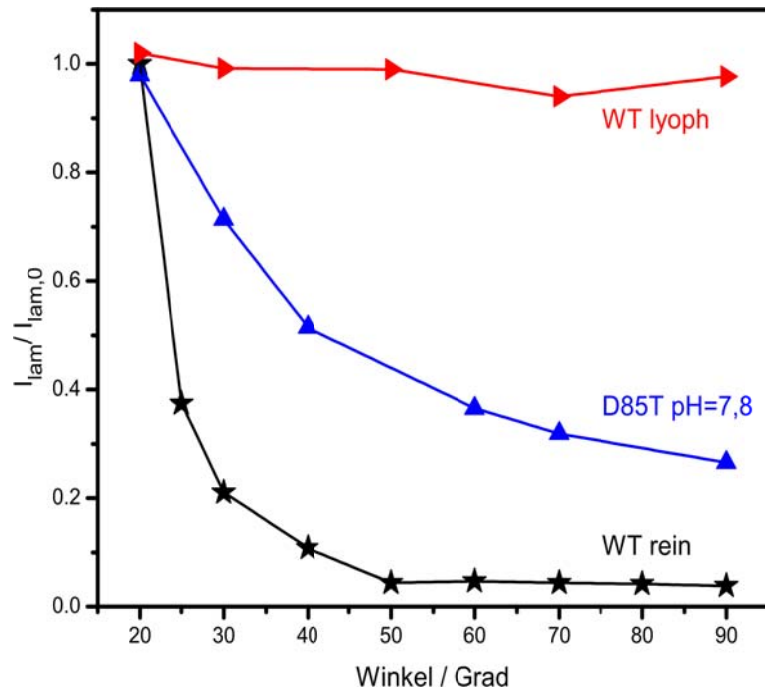


Abb. 21: Abhängigkeit der normierten Intensitäten des lamellaren Peak vom Einfallswinkel. PM-Filme: WT rein (schwarze Sternchen), D85T aus Puffer-Suspension pH=7,8 (blaue Dreiecke), lyophilisierter WT (rote Dreiecke).

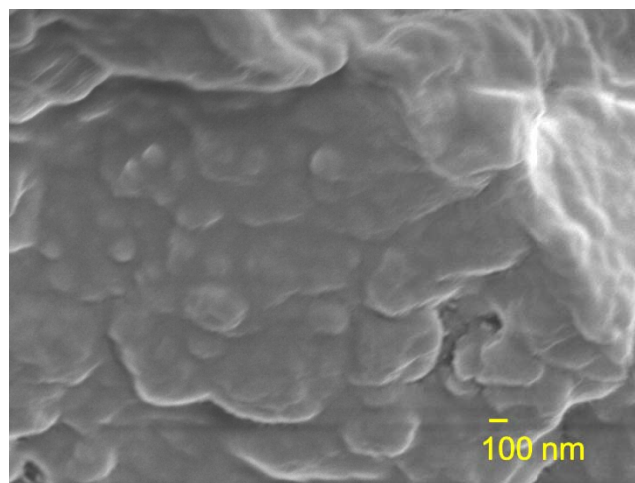


Abb. 22: SEM-Aufnahme (Bruchkante) eines getrockneten PM-D85T-Films, hergestellt aus einer Puffer-Suspension bei pH=7,8.

Filme aus gekrümmter, orientierter PM-D85T zeigen eine komplexere Abhängigkeit der Streuintensität des lamellaren Peaks vom Einfallswinkel als Filme aus flachen Membranen: aufgrund der Krümmung der einzelnen Membranen wird bereits bei einem Einstrahlwinkel von 90° ein Teil der Membranen unter 20° bestrahlt. Daher liefern bereits bei 90° Einfallswinkel ein Teil der Membranen Ergebnisse, die einem Einfallswinkel von 20° entsprechen (Abb. 23a), also den lamellaren Peak.

Flache, nichtorientierte Stapel von PM wie in einem lyophilisierten Film haben eine gleich wahrscheinliche Verteilung im Raum (Abb. 23b), und die Streukurve zeigt gleichzeitig den

Peak der lamellaren Struktur und den breiten Peak des hexagonalen Gitters. Dabei verschwinden die Peaks mit den schwächsten Intensitäten.

Für gut orientierten Stapel von PM kann man den Peak der lamellaren Struktur von  $40^\circ$  beobachten. (Abb. 23c)

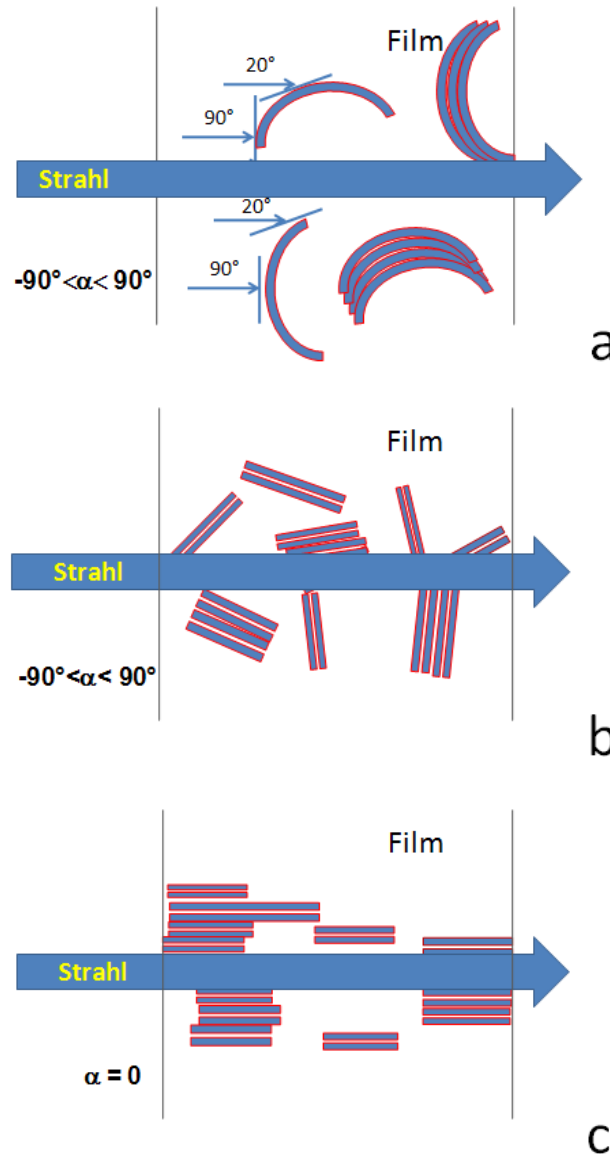


Abb. 23: Schematische Darstellung dreier PM-Filme mit unterschiedlichem Grad der Ordnung.

SAXS erlaubt also, die Orientierung von PM in Filmen zu bestimmen. Dies gelingt auch im Falle von Filmen, die aus wässrigen Lösungen von Triton X-100 mit PM getrocknet wurden. Das Verhältnis PM/Triton X-100 wurde dazu im Bereich von 2/1 bis 1/2 variiert. Die SAXS-Daten zeigen, dass mit der Zunahme des Tensid-Gehalts im Film der Verlust der Orientierung von PM einhergeht (Abb. 24). Laut der SAXS-Daten beginnt der Verlust bei einem Verhältnis PM/Triton X-100 von 1/1 (m/m), und bei Zunahme des Tensid-Gehalts bis zu 1/1,6 nehmen die PM einen nicht orientierten Zustand ein. SEM-Daten präsentieren in diesem Fall kein klares Bild (Abb. 25). Eine Orientierung der PM kann den SEM-Aufnahmen nicht zweifelsfrei entnommen werden.



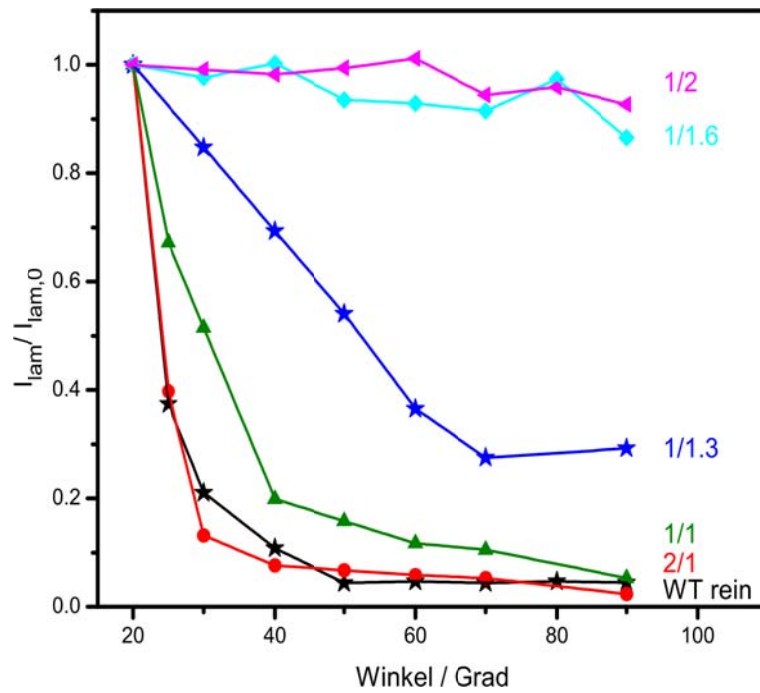


Abb. 24: Abhängigkeit der normierten Intensitäten des lamellaren Peak vom Einfallswinkel für PM-Triton X-100-Filme mit unterschiedlichem Massenverhältnis PM/Triton X-100 (von 2/1 bis 1/2).

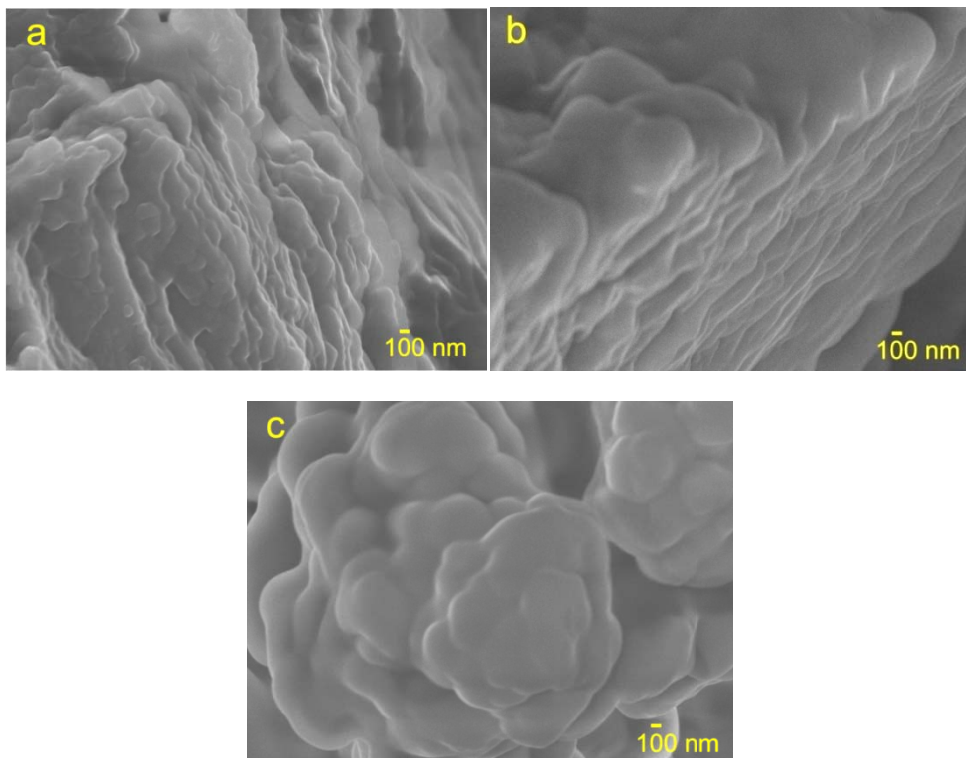


Abb. 25: SEM-Aufnahmen der (PM/Triton X-100)-Filme mit unterschiedlichem Verhältnis PM/Triton X-100. (a) PM/Triton 2/1. (b) PM/Triton 1/1,3. (c) PM/Triton 1/2.

## 5.2. Selbstorganisation von PM: Trocknung *in situ*

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst das Verhalten der lamellaren Struktur bei Trocknung von dicken und dünnen Filmen unter verschiedenen Bedingungen (PM-Konzentration, Trocknungsgeschwindigkeit, Substrateinfluss und räumlich Orientierung) analysiert. Ein dicker Film (Abb. 26a, Dicke 62  $\mu\text{m}$ ) wurde in der Kratky-Kamera bei dem Druck von 30 mbar getrocknet. Diese Bedingungen ermöglichen große Trocknungsgeschwindigkeit, deswegen kann ein Konzentrationsgradient von Wasser im Film erwarten werden. Dieser Gradient entsteht, wenn die Geschwindigkeit der Abdiffusion der Wassermoleküle von der Filmoberfläche größer als die Diffusionsgeschwindigkeit der Wassermoleküle im Film ist. Daher gibt es im Film PM-Lamellen mit einer unterschiedlichen Anzahl an Wassermolekülschichten zwischen den Membranen gibt in Abhängigkeit von der Entfernung von der Filmoberfläche – mit zunehmender Entfernung nimmt dies Anzahl zu. Auf diese Weise ist der Wassergehalt im Film nahe des Substrats größer als an der Oberfläche. Abb. 26a zeigt zwei SAXS Streukurven eines dicken Films mit verschiedenen Gesamtwassergehalten, die durch das Wiegen des Films vor und nach den einzelnen Experimenten bestimmt wurden. Dabei wurde ein relativ breiter Streupeak beobachtet. Zwei kleine Maxima bei  $s = 0,0209 \text{ \AA}^{-1}$  und  $s = 0,0196 \text{ \AA}^{-1}$  bei einem Wassergehalt von 13% mit entsprechenden Abständen von 47,3  $\text{\AA}$  und 50,3  $\text{\AA}$  sind erkennbar. Der Unterschied von 3  $\text{\AA}$  entspricht einer Schicht Wassermoleküle zwischen den Membranen. Beim weiteren Trocknen (zu 4,8% Wassergehalt im Film) nimmt die gesamte Peak-Intensität zu, darüber hinaus werden die beiden Maxima ein wenig stärker ausgeprägt. Außerdem kann man das Volumen von Wasser durch das Wiegen berechnen. Diese Werte (gemessene und berechnete) geben eine gute Übereinstimmung: 13% -12,6% für die rote Kurve und 4,8% - 5,5% für die blaue Kurve.

Im Falle eines dünnen Films (Abb. 26b, Dicke 14  $\mu\text{m}$ ) ließ man während des Trocknens den Film vor den SAXS-Messungen in einer geschlossenen Küvette relaxieren, d. h. in diesem Fall gab es keinen Wasser-Konzentrationsgradienten innerhalb des Films. Diese Probe zeigt daher für unterschiedliche Wassergehalte nur einen relativ schmalen Streupeak, die Größenverteilung der Lamellenstruktur ist klein. Bei einem Wassergehalt von 7,0 % tritt das schmale Streumaximum bei  $s = 0,0196 \text{ \AA}^{-1}$  auf, dies entspricht einer Schichtdicke von PM mit einer Schicht Wassermoleküle. Beim weiteren Trocknen bis zu einem Wassergehalt von 0,8% verschiebt sich dieser Peak zum Wert von  $s = 0,0209 \text{ \AA}^{-1}$  (47,3  $\text{\AA}$ ) mit einer kleinen Schulter bei  $s = 0,0196 \text{ \AA}^{-1}$  (50,3  $\text{\AA}$ ), das bedeutet, dass es nur wenige Bereiche gibt, in denen zwischen den PM eine monomolekulare Wasserschicht periodisch vorliegt, während zwischen den meisten PM keine Wasserschicht mehr vorliegt.



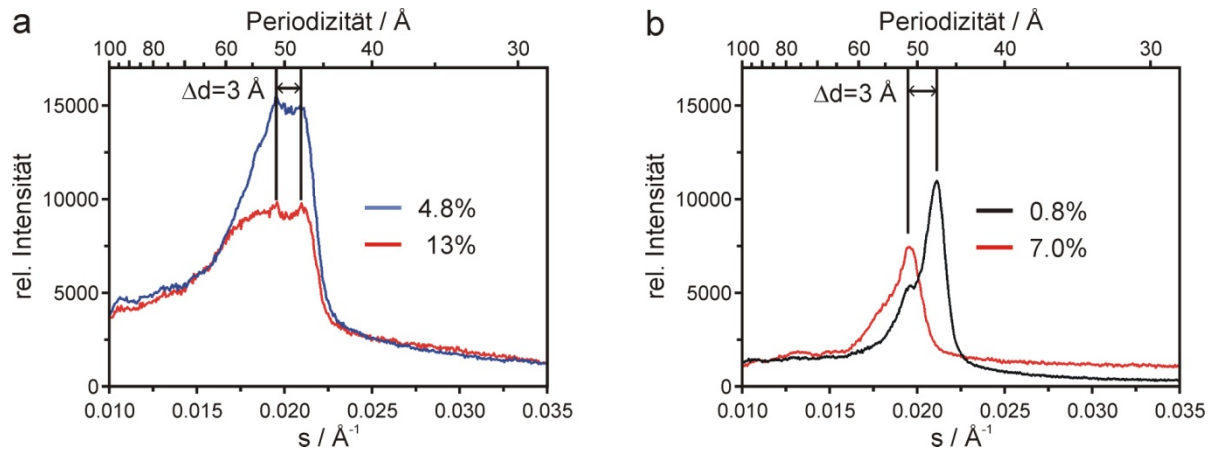


Abb. 26: SAXS-Streukurven orientierter PM-Filme mit unterschiedlichem Wassergehalt im Film, gemessen unter einem Einfallswinkel von  $20^\circ$ - $90^\circ$ . (a) 62  $\mu\text{m}$  dicker Film mit einem Wassergradient, (b) 14  $\mu\text{m}$  dicker Film im Gleichgewicht.

Weitere Nuancen des Trocknungsverhaltens der PM-Filme bei niedrigen Feuchtigkeitswerten sind in Abb. 27 zusammengefasst. SAXS-Messungen wurden für die PM-Filme mit abnehmendem Wassergehalt von 12 bis 0% durchgeführt. Bei einem Gehalt von 12% liegt der Hauptpeak der lamellaren Struktur bei  $s = 0,0183 \text{ \AA}^{-1}$  (54,5  $\text{\AA}$ , Abb. 27a). Der Wert von  $s$  entspricht der Dicke einer Membrane mit mehr als zwei Schichten von Wassermolekülen, das bedeutet, dass Lamellen mit unterschiedlichen Mengen an Wassermolekülschichten im Film vorliegen. Während der Trocknung verschiebt sich der Peak der lamellaren Struktur zu höheren Streuvektoren und zeigt eine Abnahme der Periodizität bis zu  $s = 0,0212 \text{ \AA}^{-1}$  (47,2  $\text{\AA}$ ), d. h. bis zur Dicke einer Membran ohne Wasserschicht.

Zwischen 0% und 12% Wassergehalt im Film verschiebt der Hauptpeak seine Position kontinuierlich und zeigt auch Schultern, zum Beispiel besitzt die bei 0,2% gemessene Streukurve eine Schulter bei  $s = 0,0198 \text{ \AA}^{-1}$  (50,3  $\text{\AA}$ ). Dieser Wert der Periodizität entspricht dem für eine Membran mit einer Schicht Wassermoleküle. Folglich ist der ganze Streupeak das Ergebnis der Lamellenstrukturen von PM ohne und mit einer Wasserschicht, und dies lässt sich auf alle weiteren Streupeaks entsprechend des Wassergehalts übertragen, d. h., dass mit abnehmendem Wassergehalt zuerst die Menge an PM mit zwei Wasserschichten abnimmt und gleichzeitig die Menge mit einer Wasserschicht zunimmt. Bei weiterer Trocknung verschwindet der Streupeak von PM mit Wasserschichten, während ein Peak für eine Lamellenstruktur ohne Wasser auftritt. Als Ergebnis resultiert eine Verschiebung zu einem höheren Streuvektor während der Entfernung des Wassers aus dem Film bis zum Streupeak für den trockenen Film.

Die Position des Hauptmaximums zeigt bis zu einem Wassergehalt von 12% eine lineare Abhängigkeit vom Wassergehalt (Abb. 27b), das heißt, der Wassergehalt des PM-Film in diesem Bereich kann durch SAXS-Messungen bestimmt werden.

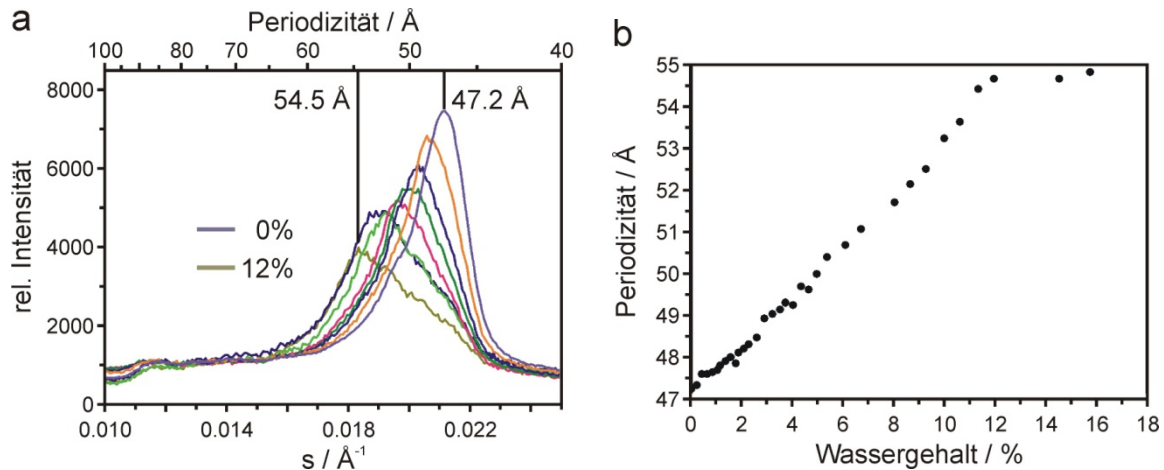


Abb. 27: (a) SAXS-Streukurven eines orientierten PM-Films in der Abhängigkeit vom Wassergehalt (12% bis 0%) bei einem Einfallswinkel 20°-90°. (b) Position des lamellaren Peaks in Abhängigkeit vom Wassergehalt.

Für die Untersuchung der Selbstorganisation von PM bei der Trocknung der wässrigen Suspension wurde dieser Vorgang *in situ* bei drei unterschiedlichen Einfallswinkeln (Abb. 16) gemessen.

**Einstrahlwinkel 20°-90°.** In Abb. 28a sind Streukurven eines PM-Films bei Trocknung von 90% Wassergehalt bis 0% gezeigt. Bei 90% ist eine schwache ausgeprägter Peak (1;1) zu erkennen, zudem ein breiter Peak bei kleinerem Streuvektor. Im Verlauf der Trocknung verschwindet der Peak (1;1) und die Intensität des breiten Peak nimmt zu. Zudem verschiebt sich die Lage dieses Peaks ab 70% Wassergehalt im Film in Richtung größerer Werte des Streuvektors  $s$ . Bei ca. 40% Wassergehalt erreicht er den Wert  $s = 0,023 \text{ Å}^{-1}$ .

Die weitere Trocknung bis ca. 30% Wassergehalt führt zum Verschwinden dieses Peaks, und gleichzeitig erscheint der Streupeak der lamellaren Struktur. Dieser entsteht in Position von  $s = 0,0167 \text{ Å}^{-1}$ , dies entspricht einer Periodizität der Lamellen von  $59,9 \text{ Å}$  oder einem Abstand von  $12,6 \text{ Å}$  zwischen den Membranen. Dieser Abstand von  $12,6 \text{ Å}$  stimmt mit 4 Schichten von Wassermolekülen überein. Folglich findet bei ca. 30% Wassergehalt im Film der Übergang von einem unbekannt streuenden Ensemble zur stabilen lamellaren Struktur mit 4 Schichten Wassermoleküle statt. Dies steht im Gegensatz zu früheren SAXS-Ergebnissen, die für die Periodizität der Lamellenstruktur Entfernungen bis zu  $150 \text{ Å}$  [76] und  $400 \text{ Å}$  [80] zeigen. Dieses Verhalten ist ebenfalls unterschiedlich zum dem Fall von PM-Filmen mit Glycerin, wie im nächsten Kapitel dargestellt wird.

Die weitere Trocknung führt zur Vergrößerung der Intensität des Peaks der lamellaren Struktur, und der lamellare Peak verschiebt sich bis zu der Position, die dem ganz getrockneten Film entspricht.

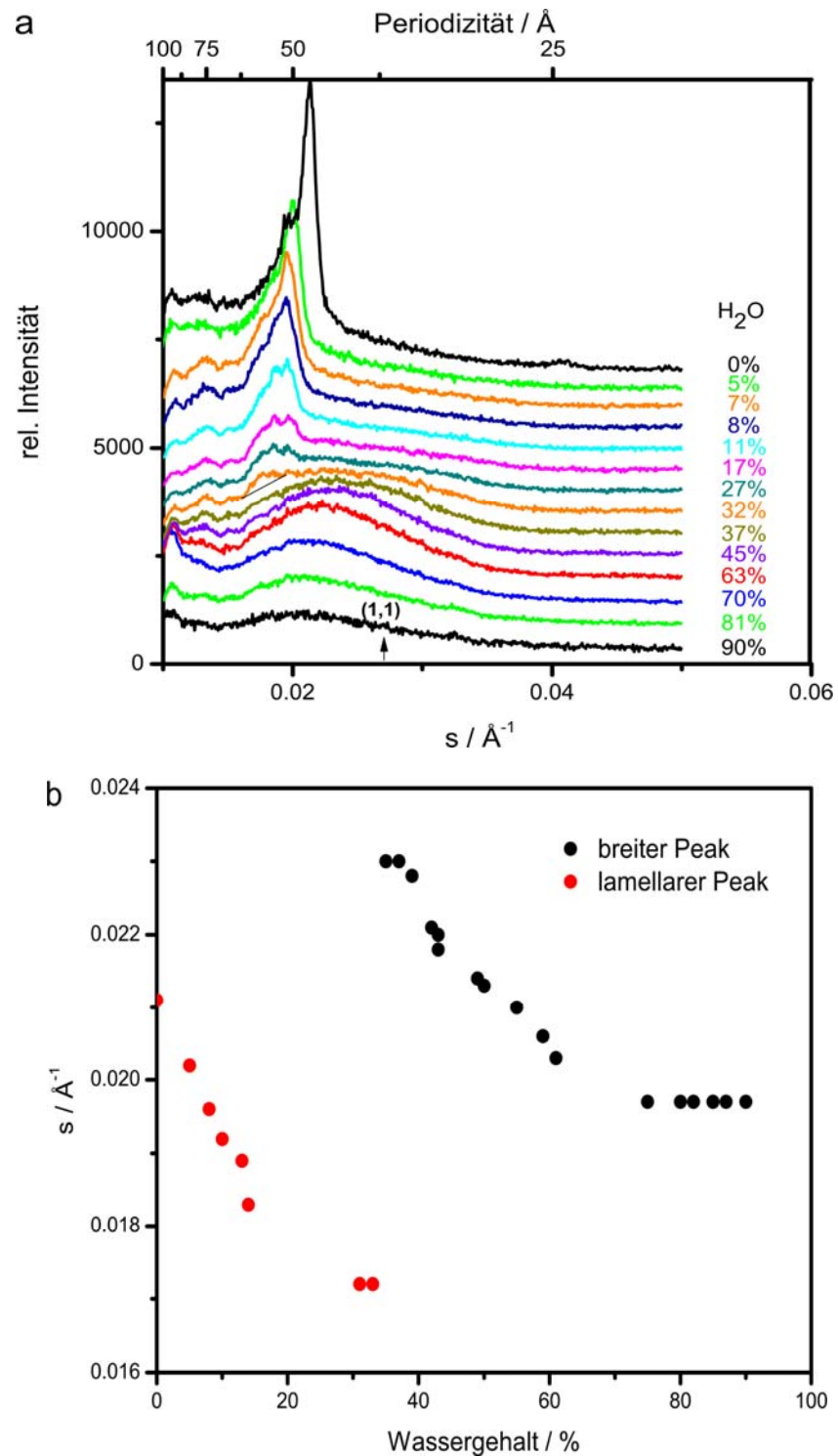


Abb. 28: (a) SAXS-Streukurven von eines PM-Films bei Trocknung mit einem Wassergehalt von 90 bis 0%, gemessen bei einem Einfallswinkel von  $20^\circ$ - $90^\circ$ . (b) des Hauptpeaks der Streukurve als Funktion von Wassergehalt im Film.

Die Positionen des breiten Peaks und des Peaks der lamellaren Struktur in Abhängigkeit vom Wassergehalt im Film ist in Abb. 28b zusammengefasst.

**Einstrahlrichtung  $90^\circ$ - $90^\circ$ .** In Abb. 29 sind die unter dem Einfallswinkel  $90^\circ$ - $90^\circ$  (Abb. 16). zur Filmoberfläche gemessenen Streukurven während der Trocknung dargestellt. Ab der ersten Messung (90% Wassergehalt, die Messzeit betrug ca. 15 min.) ist eine gut erkennbare Streukurve der Suspension von PM zu erkennen, und schon bei 70% Wassergehalt in der Probe ist eine Zunahme der Streuintensität des hexagonalen Gitters und gleichzeitig die Abnahme der Intensität des breiten Peaks zu beobachten. Dieses Phänomen ist bei der Trocknung von PM-Filmen immer zu sehen. Bei ca. 50% Feuchtigkeit der Probe zeigt die Streukurve des hexagonalen Gitters die gleiche Form und Intensität wie im Fall ganz des getrockneten Films, d. h., dass sich die Membranen in dieser Messrichtung bereits in einem orientierenden Zustand befinden.

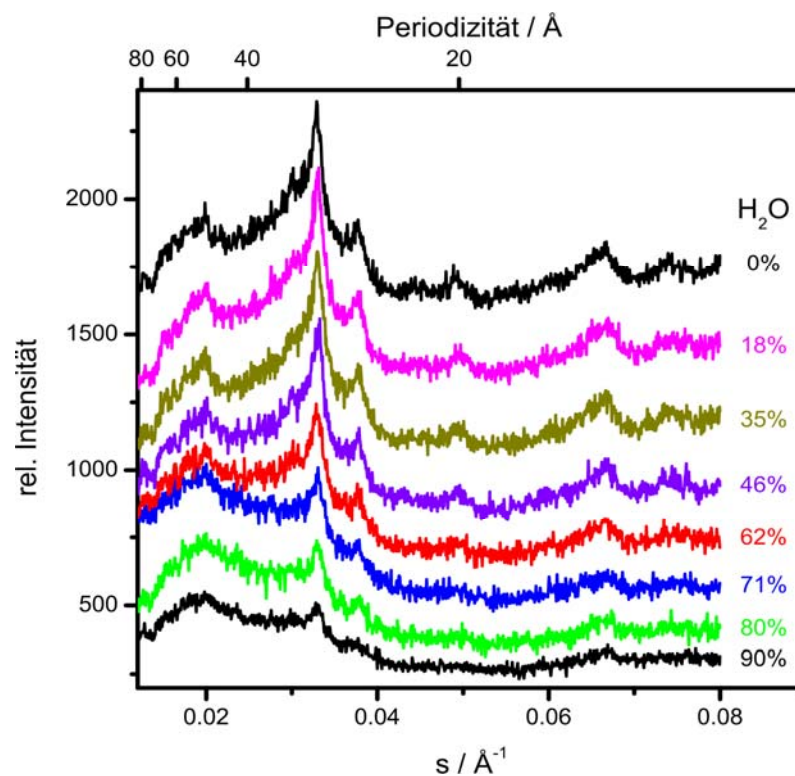


Abb. 29: SAXS-Streukurven des schon in Abb. 28 gezeigten PM-Films, gemessen bei Trocknung unter einem Einfallswinkel von  $90^\circ$ - $90^\circ$ .

Abb. 30a zeigt Messungen bei einem Einfallswinkel  $90^\circ$ - $90^\circ$  an einem PM-Film, dem zudem erlaubt wurde, zwischen den SAXS-Messungen zu relaxieren. Das bedeutet, dass während den Messungen keine Strukturänderungen im Film stattfinden. Die Streukurven zeigen, dass bereits bei 55% Wassergehalt die PM in eine Richtung vollständig orientiert sind. Zur Bestimmung der Lage der PM zueinander sind hier zudem die Messergebnisse unter einem Einfallswinkel von  $20^\circ$ - $90^\circ$  gezeigt. Bei diesem Einfallswinkel erscheint das Streusignal der lamellaren Struktur bei 31% Wassergehalt im Film, folglich sind alle PM parallel zueinander angeordnet. Die absolute Lage der PM in Bezug auf die Filmoberfläche wird im Kapitel 5.2.2 erläutert.

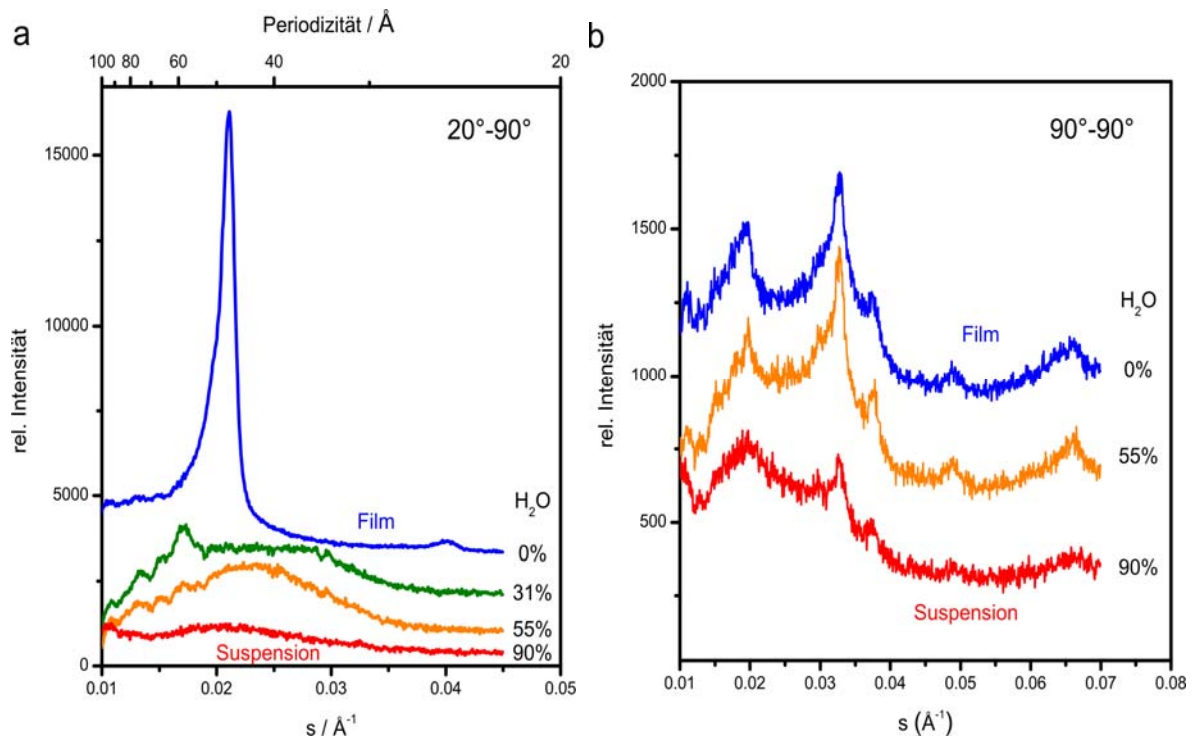


Abb. 30: (a) SAXS-Streukurve der feuchten Filme. SAXS-Streukurven von einem PM-Film bei Trocknung mit einem Wassergehalt von 90 bis 0% mit einer Relaxation vor Messung. (a) Gemessen bei einem Einfallswinkel von  $20^\circ$ - $90^\circ$ , (b) gemessen bei einem Einfallswinkel von  $90^\circ$ - $90^\circ$ .

**Vergleich der Einstrahlrichtungen  $90^\circ$ - $90^\circ$  und  $20^\circ$ - $90^\circ$ .** Der Vergleich der Streuung der beiden Richtungen ( $90^\circ$ - $90^\circ$  und  $20^\circ$ - $90^\circ$ , Abb. 31, gewonnen aus den Abb. 28a und 29) zeigt ein gewisses Maß an Orientierung von PM schon vor Beginn der Trocknung (bei 90%). Schon ab der ersten Messung (erste 15 Minuten, 90% Wassergehalt) sieht man quantitative Unterschiede: bei einem Winkel von  $90^\circ$ - $90^\circ$  (rote Kurve) gibt es eine erkennbare Streukurve der hexagonalen Struktur, bei  $20^\circ$ - $90^\circ$  sieht man den Peak (1;1) nur ganz schwach (schwarze Kurve). Bei 70% Wassergehalt im Film treten schon qualitative Unterschiede auf: unter dem Winkel  $20^\circ$ - $90^\circ$  verschwindet die Streuung des hexagonalen Gitters, und es bleibt nur ein breiter Peak, der sich mit der Trocknung bis zu einem Streuvektors von  $s = 0,023 \text{ \AA}^{-1}$  verschiebt, dabei wird unter dem Winkel  $90^\circ$ - $90^\circ$  die Streukurve des hexagonalen Gitters beobachtet.

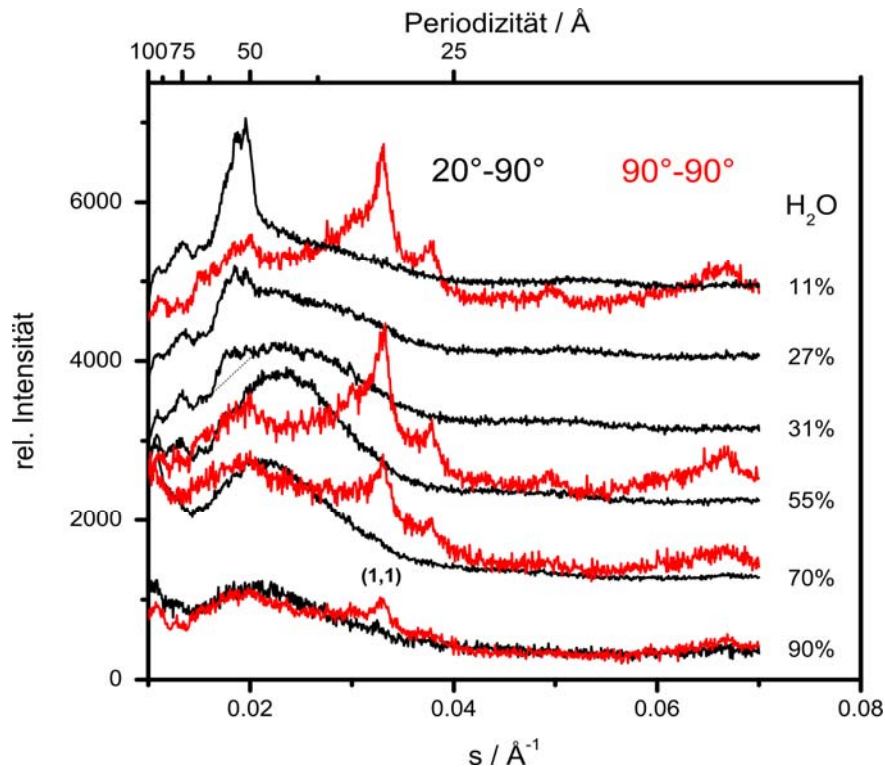


Abb. 31: Vergleich der unter Abb. 28a (schwarze Kurven) und 29 (rote Kurven) gezeigten SAXS-Streukurven eines PM-Films beim Trocknen.

Bei 55% Wassergehalt im Film hat die Streukurve für den Einfallswinkel 90°-90° die gleiche Form und Intensität wie die Streukurve des getrockneten Films. Wie schon beschrieben beobachtet man unter dem Einfallswinkel 20°-90° einen breiten Streupeak bei  $s = 0,023 \text{ Å}^{-1}$ . Mit fortschreitender Trocknung finden weitere Änderungen der Streusignale nur in der zur Filmoberfläche fast parallelen Messrichtung (unter 20°-90°) statt. Der Peak der lamellaren Struktur entsteht gleichzeitig mit dem Verschwinden des breiten Streupeaks bei 31% Feuchtigkeit des Films. In Abb. 31 ist dies durch einen Untergrundgerade hervorgehoben. Dies unterstützt die bereits oben gezogenen Schlussfolgerungen über die Orientierung von PM im Film.

**Einstrahlrichtung 90°-20°.** Bei einem Einfallswinkel von 90°-20° zeigt das Experiment das gleiche Streubild wie bei 90°-90° (Abb. 32a). Bei 55% Wassergehalt erreichen die Intensitäten des (1;1)-Peaks für beide Einstrahlwinkel ihren Maximal- und Endwert (Abb. 32b,c).



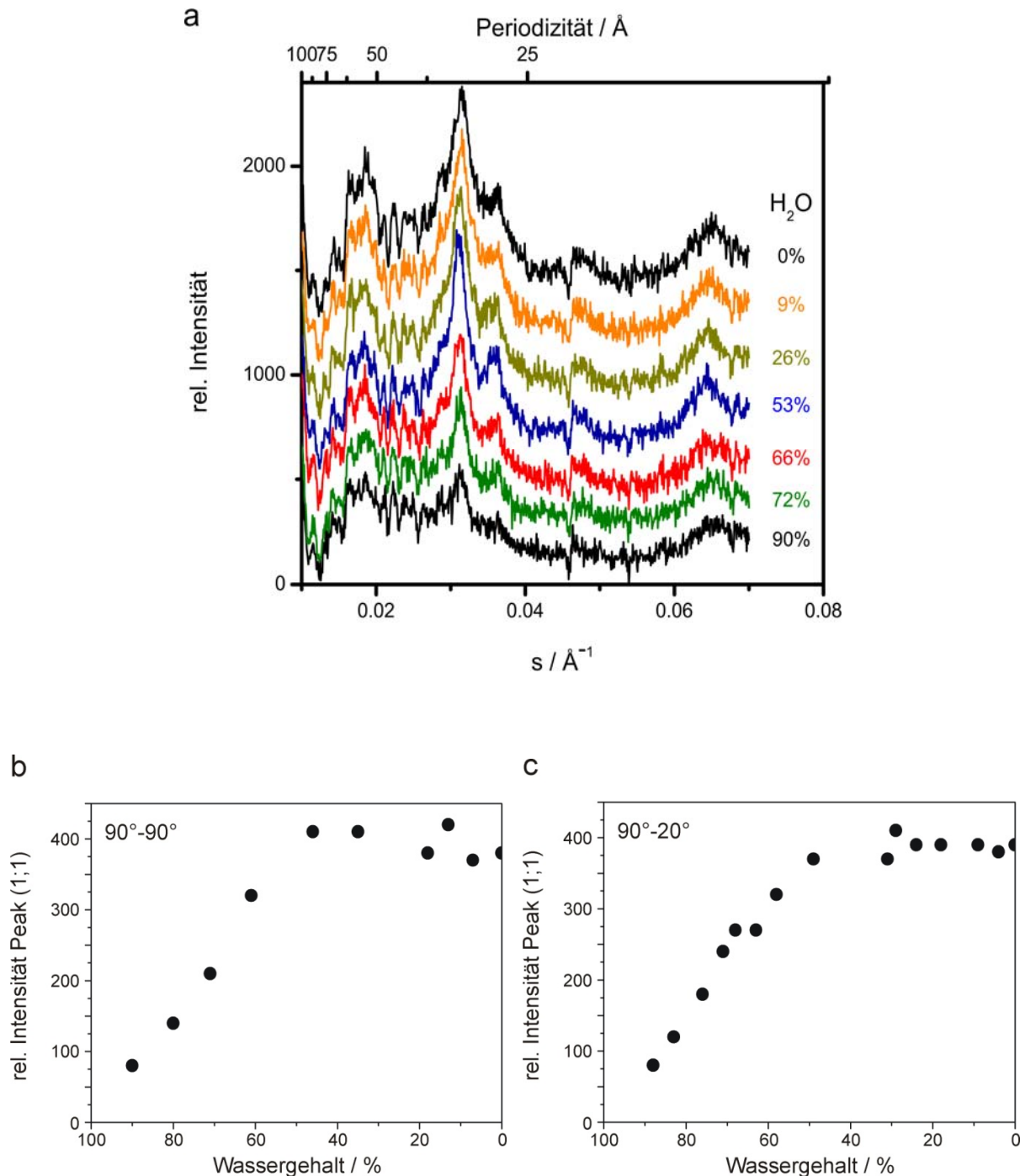


Abb. 32: (a) SAXS-Streukurven des schon in Abb. 28a, 29 und 31 gezeigten PM-Films, gemessen bei Trocknung unter einem Einfallswinkel von 90°-20°. (b) Abhängigkeit der SAXS-Intensität des Peaks (1;1) von Wassergehalt im PM-Film bei verschiedenen Einfallswinkeln. Einfallswinkel 90°-90°, (c) Einfallswinkel 90°-20°.

Die Daten, die die Entstehung der stabilen lamellaren Struktur bei ca. 30% Wassergehalt im Film zeigen, können mit Hilfe von Untersuchungen bei der Trocknung eines Films mit einem örtlichen Defekt wie z.B. dem Auftreten von Blasen bei der Filmtrocknung oder einer Krümmung des Films bestätigt werden. Bei Gegenwart von Blasen (Abb. 33) kann gleichzeitig die Änderungen der Streueigenschaften des Films unter dem Winkel 90°-20° und 20°-90° und folglich die hexagonale und die lamellare Strukturen beobachtet werden (Abb. 34). Die

Orientierung des Films unter dem Winkel  $90^\circ$ - $20^\circ$  ist am günstigsten für die simultane Beobachtung der lamellaren und hexagonalen Strukturen.

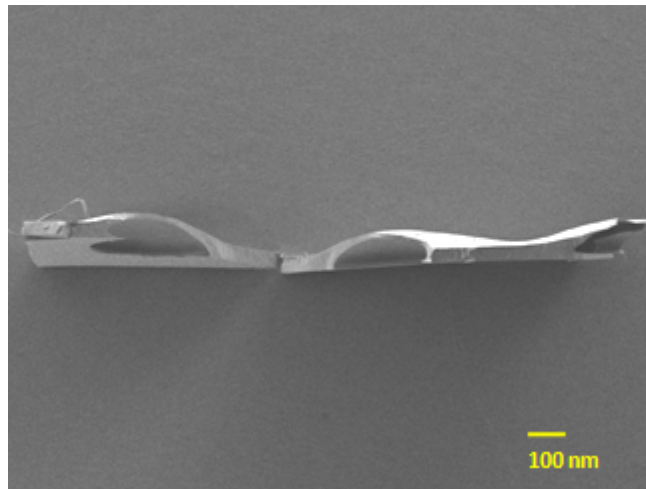


Abb. 33: SEM-Aufnahme eines PM-Films mit Blasen.

Die Analyse des Streubildes (Abb. 34) zeigt eine Vergrößerung der Intensität des Peaks (1;1) während der Trocknung und gleichzeitig die Entstehung des breiten Peaks, der sich während der Trocknung des Films zu einem Wert von etwa  $0,023 \text{ \AA}^{-1}$  verschiebt. Bei ca. 30% Wassergehalt im Film erscheint der Peak der lamellaren Struktur in einer Position, die vier Schichten Wassermoleküle entspricht, gleichzeitig verschwindet der breite Peak. Dabei besitzt der Peak (1;1) des hexagonalen Gitters die gleiche Intensität wie im getrockneten Film.

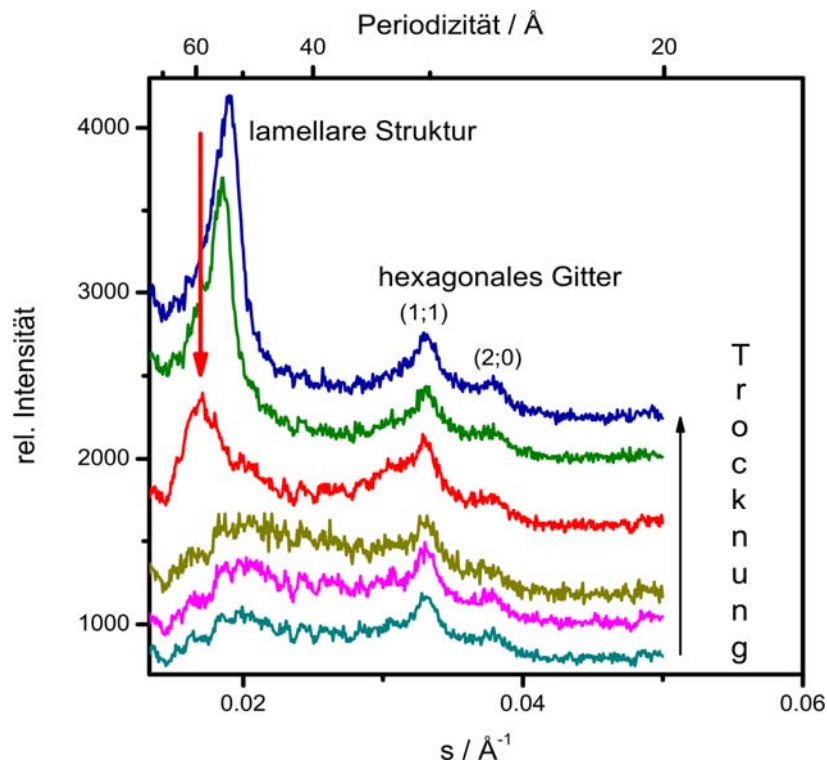


Abb. 34: SAXS-Streukurven eines PM-Films mit Blasen bei Trocknung mit einem Wassergehalt von 90 bis ca. 10%, gemessen unter einem Einfallswinkel von  $90^\circ$ - $20^\circ$ .



Bei Trocknung einer dicken Probe mit ungeordneter PM wird ein sehr ähnliches Verhalten beobachtet (Abb. 35). Das erste Auftreten des Peaks der lamellaren Struktur findet bei einem Streuvektor statt, dem vier Schichten Wassermoleküle zwischen den Membranen entsprechen.

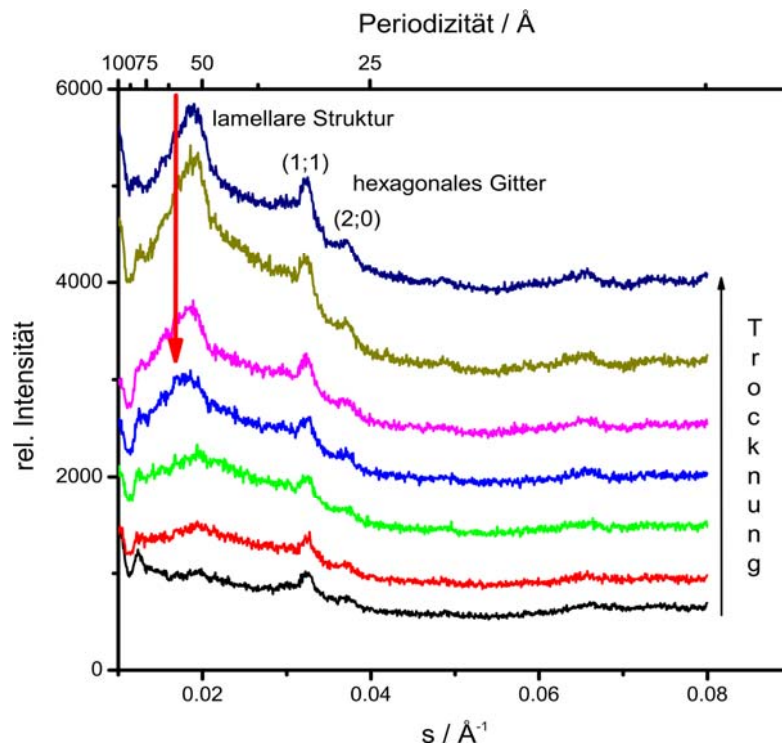


Abb. 35: SAXS-Streukurven eines nicht orientierten PM-Films bei Trocknung mit einem Wassergehalt von 96 bis ca. 20%, gemessen bei einem Einfallswinkel von  $90^\circ$ - $90^\circ$ .

### 5.2.1. Lyophilisation *in situ*.

Die Untersuchung des Gefriertrocknungsprozesses von PM ist interessant für das Verständnis der Dehydratation und des Einfrierprozesses von PM und des Rekristallisationsprozesses von Eis in den Proben. [92-94]

Eine Wechselwirkung von Wasser mit Biomembranen wurde bei Dehydratation und während des Einfrierens schon mehrfach für Modellsysteme [81-83] und für PM [84-91] untersucht. Hier wird ein Gefriertrocknungsprozess beobachtet.

In Abb. 36 sind die Streukurven einer tiefgefrorenen wässrigen PM-Suspension dargestellt. Beim Einfrieren bis zur Temperatur flüssigen Stickstoffs findet die „ice-induced“ Dehydratation des Raums zwischen den Membranen [83] statt, das heißt, eine Diffusion von Wasser aus den PM-Lamellen während der Eisbildung im Raum außerhalb der PM-Stapel.

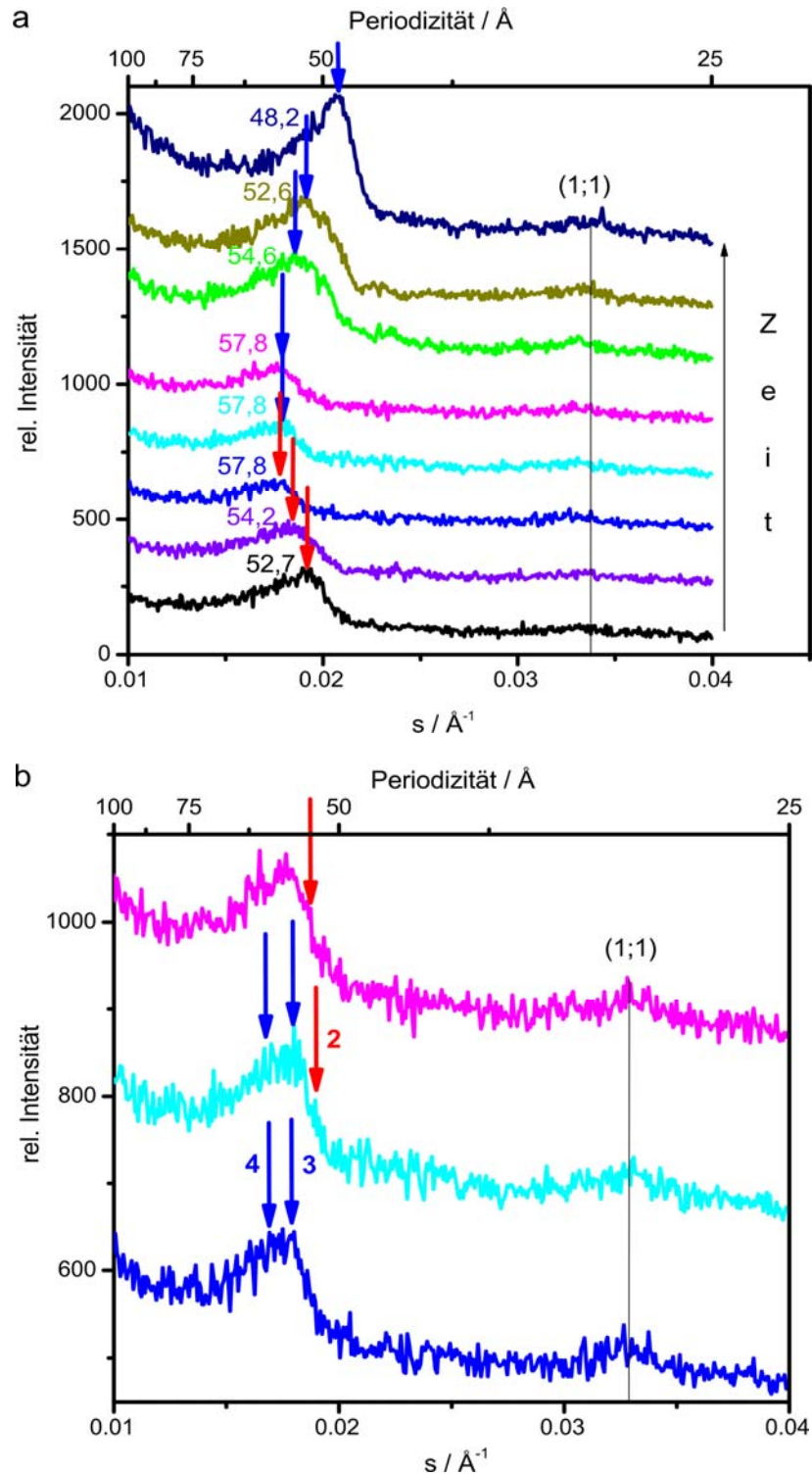


Abb. 36: (a) SAXS-Streukurven einer gefrorenen WT-PM-Suspension bei Sublimation in der Kratky-Kamera, gemessen bei einem Einfallswinkel von  $90^\circ$ - $90^\circ$ . (b) Vergrößerung der Streukurven (blau, hellblau, lila). Die Pfeile zeigen lamellare Strukturen mit 2, 3 und 4 Schichten der Wassermolekülen zwischen den PM.

Bei der Temperatur des flüssigen Stickstoffs besitzt die lamellare Struktur eine Periodizität von  $52,7 \text{ \AA}$  (entspricht zwei Schichten Wassermoleküle zwischen den PM in den Lamellen), welches in guter Übereinstimmung mit der Literatur ist [85,88-90]. Im Unterschied dazu findet bei einer Erwärmung der Probe in der Kratky-Kamera eine Vergrößerung der Periodizität

der lamellaren Struktur bis zu  $57,8 \text{ \AA}$  statt, das entspricht 3,5 Schichten Wassermoleküle. Einen physikalischen Sinn von „3,5 Schichten“ kann man mit Hilfe von Abb. 16b erklären. Der breite Peak der lamellaren Struktur besteht aus einer Summe von zwei etwa gleich intensiven Peaks bei einem Streuvektor resultierend aus vier Schichten Wassermolekülen zwischen den Membranen und entsprechend aus drei Schichten resultierend (blaue Pfeile in Abb. 36b). Diese Zunahme der Periodizität findet wegen des Aufschmelzens des Eises im Film, das Wasser diffundiert wieder zwischen die PM in den Lamellen. Auf diese Weise wurden die erste und die zweite Hydrathülle von PM bei verschiedenen Temperaturen beobachtet, d. h. stark (erste Hydrathülle) und schwach (zweite Hydrathülle) gebundenes Wasser. Bei niedriger Temperatur wurde eine lamellare Struktur mit zwei stark gebundenen Wasserschichten (erste Hydrathülle) beobachtet, bei einer höheren Temperatur wird die zweite Hydrathülle gebildet.

Mit zunehmender Dauer des Experiments bleibt die gemessene Periodizität zunächst konstant, vermutlich weil Wärmezufuhr und Wärmeabfluss bei der Sublimation gleich sind und dieser Vorgang im Gleichgewicht ist. Bei weiterer Sublimation nimmt die Intensität der Streukurven im Bereich sehr kleiner Streuvektoren wegen der Entstehung von Poren zwischen den PM-Stapeln zu, dabei verschiebt sich der lamellare Peak wegen der Sublimation und dem damit verbundenen Entfernen des Wassers aus dem Raum zwischen den Membranen zu einer Position für die Periodizität von etwa  $48 \text{ \AA}$ . Der Endwert der Periodizität der lamellaren Struktur beträgt  $48 \text{ \AA}$  und ist damit ein wenig größer als im Fall von PM-Filmen, die aus wässriger Suspension getrocknet wurden ( $47,2 \text{ \AA}$ ).

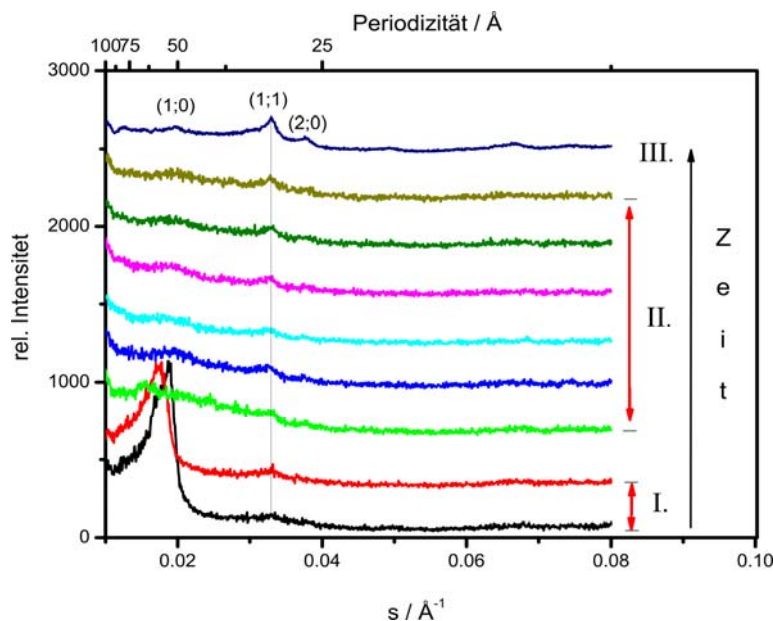


Abb. 37: SAXS-Streukurven einer tief gefrorenen PM-WT-Suspension. Der Vorgang besteht aus drei Phasen: Phase 1 – eine Probe befindet sich im gefrorenen Zustand (schwarze und rote Kurven), Phase 2 – eine PM-Suspension, Phase 3 – getrockneter orientierter Film (dunkelblaue Kurve mit gekennzeichneten Reflexen). Das SAXS-Experiment wurde bei einem Einfallswinkel von  $90^\circ$ - $90^\circ$  durchgeführt.

Dass die Probe in der Kratky-Kamera gefroren war wurde indirekt nachgewiesen. Als Indikator diente einerseits ein Wassertropfen, der auf dem Probenhalter aufgebracht war und dessen Aggregatzustand beobachtet wurde (siehe Kapitel 3.2.5.). Außerdem wurde eine Probe ge-

messen, die während der Messung geschmolzen ist (Abb. 37). Diese Probe wurde bei einem Luftdruck von 40 mbar unter einem Winkel  $90^\circ$ - $90^\circ$  gemessen. Während der ersten 400 Sekunden befand sich die Probe im gefrorenen Zustand. In diesem Zeitraum wurden zwei Messungen durchgeführt. Wie aus Abb. 17 zu sehen ist, ist aus der ersten Messung eine Periodizität der lamellaren Struktur von  $52,8 \text{ \AA}$  zu ermitteln, bei Erwärmung verschiebt sich der Peak zu einem Wert der Periodizität der lamellaren Struktur von  $57,4 \text{ \AA}$ . Die weiteren, im Anschluss gemessenen Streukurven zeigen keinen lamellaren Peak mehr, die Probe war geschmolzen und die lamellare Struktur verschwunden. Die Probe streut nun wie eine wässrige Suspension, der (1;1)-Peak ist schwach zu erkennen. Die Probe trocknet nun weiter wie für Filme aus wässrigen Suspensionen, schließlich entsteht die Streukurve des hexagonalen Gitters. Auf diese Weise ist zu erkennen, ob eine Probe während einer Messung eingefroren ist oder nicht.

Bei der Gefriertrocknung der Mutante D85T finden die gleiche Veränderungen statt (Abb. 38), aber die Position des Peaks der lamellaren Struktur verschiebt sich um  $3 \text{ \AA}$ , weil die Dicke der Membranen von D85T  $50 \text{ \AA}$  beträgt.

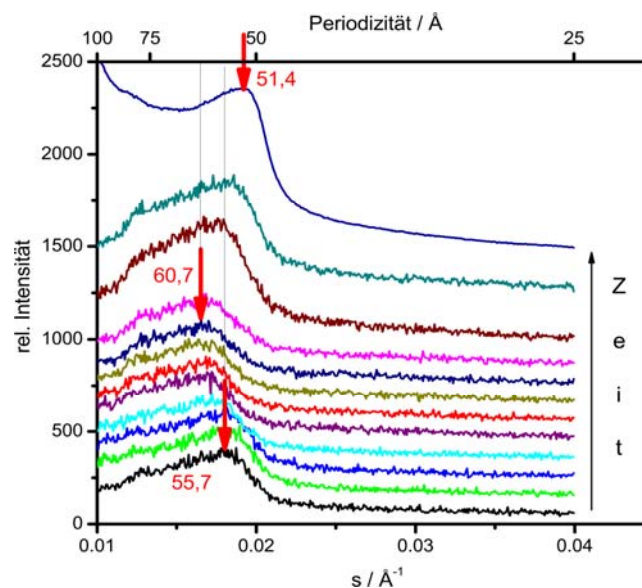


Abb. 38: SAXS-Streukurven einer gefrorenen PM-D85T-Suspension bei Sublimation in der Kratky-Kamera, gemessen bei einem Einfallswinkel von  $90^\circ$ - $90^\circ$ .

Im Fall der Gefriertrocknung wurden somit in beiden Fällen PM-Lamellen mit vier Wasserschichten zwischen den PM beobachtet und es ist aus den Experimenten zu erkennen, dass die stabilen Lamellen bei Trocknung aus PM mit gebundenem Wasser entstehen.

### 5.2.2. SEM-Untersuchung von orientierten getrockneten PM-Filmen

SEM gibt eine anschauliche Information über die Struktur der PM-Filme. SEM-Aufnahmen wurden von unterschiedlich hergestellten PM-Filmen aufgenommen. In Abb. 19 sind die SEM-Aufnahmen zweier dünnen Filme mit den Dicken  $5,5\ \mu\text{m}$  (Abb. 39 a und b) sowie  $23\ \mu\text{m}$  (Abb. 39 c und d) unter verschiedenen Vergrößerungen gezeigt.

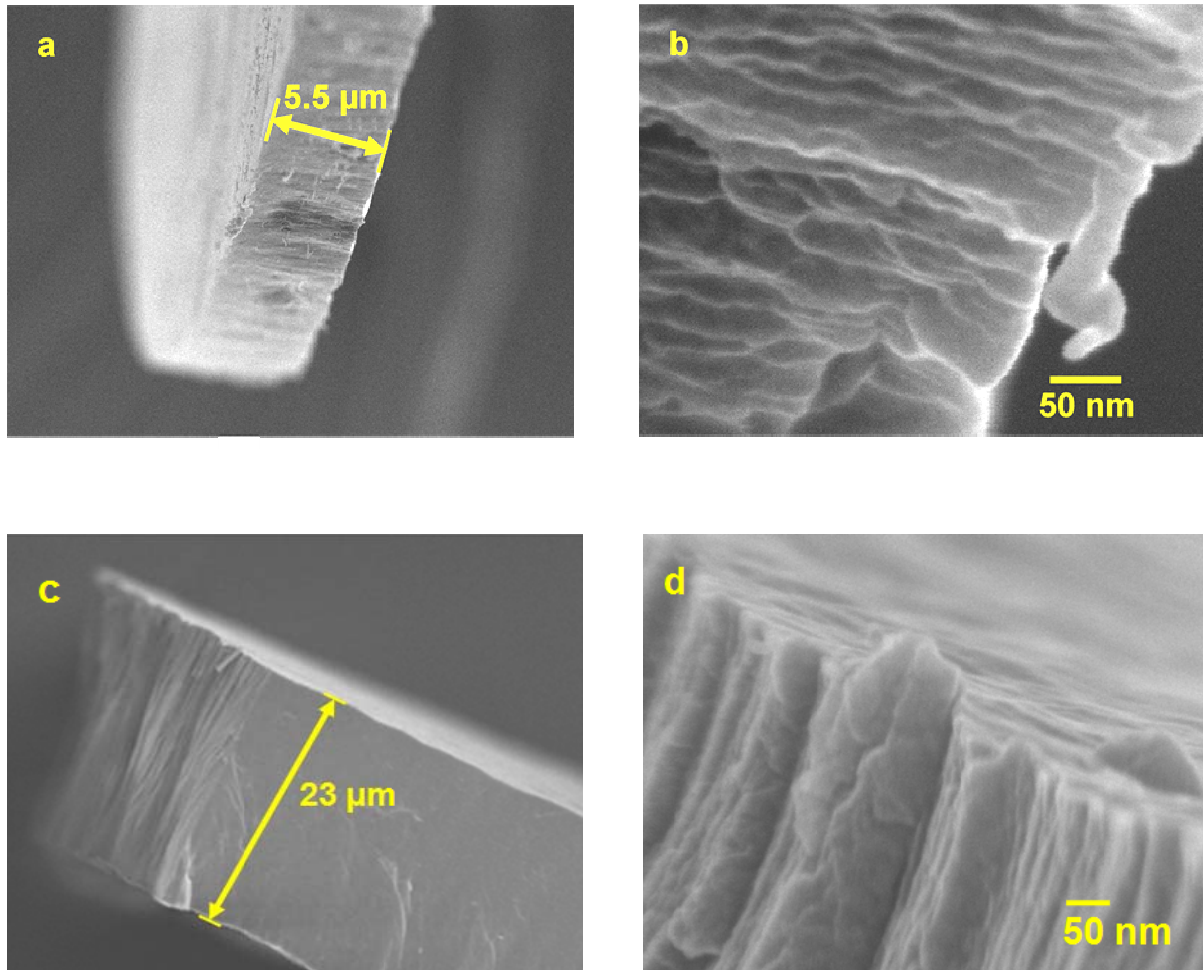


Abb. 39: SEM-Aufnahmen von orientierten getrockneten, auf einem hydrophoben Substrat präparierten PM-Filmen. Die PM stehen senkrecht zur Filmoberfläche. (a, b)  $5,5\ \mu\text{m}$  dicker Film. (c, d)  $23\ \mu\text{m}$  dicker Film.

In diesen Abbildungen sieht man gleichzeitig die Bruchkante und die Oberfläche der Filme. Das erlaubt eindeutig die Orientierung von PM im Film zu bestimmen. In Abb. 39 sind PM-Filme, getrocknet auf einem hydrophoben Substrat, gezeigt. Bei einer Vergrößerung von etwa 200000 (Abb. 39 b, d) kann man senkrecht zur Filmoberfläche orientierte PM erkennen.

Die gleiche Orientierung von PM im Film sieht man in einem sehr dünnen Film (Abb. 40). Die Dicke dieses Films beträgt ca.  $400\ \text{nm}$ . Wie im einführenden Kapitel 3.1.1 gezeigt, weisen die hier verwendeten PM eine laterale Größenverteilung im Bereich von  $50\text{-}400\ \text{nm}$  auf. Daher können auch in einem Film der Dicke  $400\ \text{nm}$  die PM senkrecht zur Oberfläche stehen.



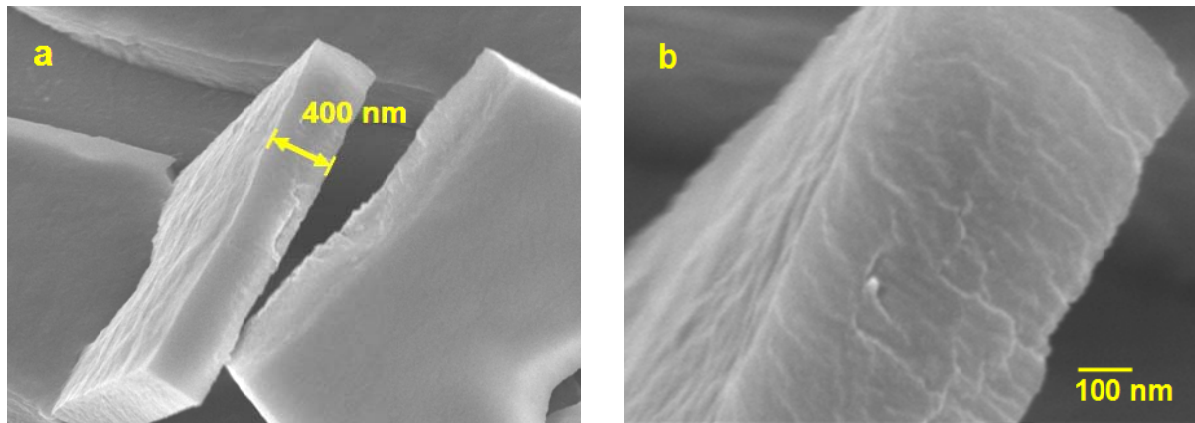


Abb. 40: SEM-Aufnahmen eines 400 nm dicken, orientierten, auf einem hydrophilen Substrat getrockneten PM-Films. (a) Übersicht, (b) Vergrößerung der Bruchkante. Die PM stehen senkrecht zur Filmoberfläche.

In Abb. 40 b ist gut zu erkennen, dass die PM senkrecht zur Filmoberfläche und in diesem Fall fast parallel zur Bruchkante orientiert sind.

In Abb. 41 sind gleichzeitig die Bruchkante und die Filmoberfläche eines etwas dickeren, aber ebenfalls auf einem hydrophilen Substrat präparierten PM-Films gezeigt. In der Bruchkante sind die PM genauso wie in Abb. 40 b orientiert, sie sind somit senkrecht zur Filmoberfläche orientiert. Zudem ist zu erkennen, dass einige PM aus der Filmoberfläche herausragen.

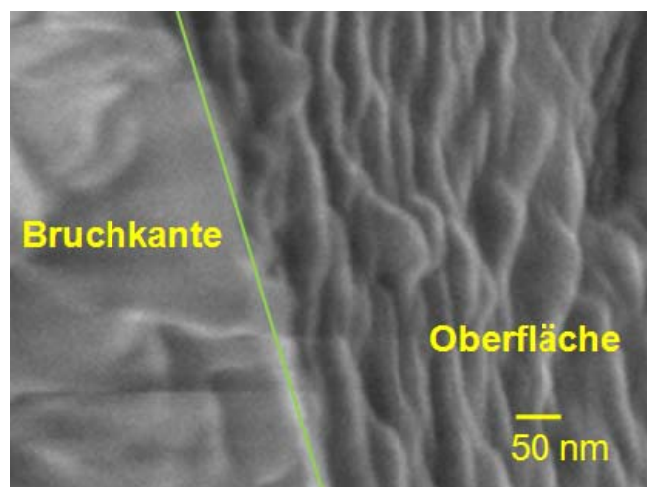


Abb. 41: SEM-Aufnahme eines auf einem hydrophilen Substrat orientierten, getrockneten PM-Films. Zu sehen sind eine Bruchkante sowie die Filmoberfläche.

Schon im Jahr 1992 hat *Sakata* [95] gezeigt, dass biologische Membranen, die hydrophile Flächen und hydrophobe Kanten aufweisen, in einer wässrigen Suspension senkrecht zur Wasser-Luft-Grenzfläche stehen. Diese Arbeit hatte keinen Einfluss auf die bisherigen Vorstellungen von der Orientierung von PM in Filmen, und derzeit wird behauptet, dass der Aufbau eines orientierten Films durch einen Sedimentationsprozess bei der Trocknung stattfindet.

Die hier durchgeführten Untersuchungen unterstützen die von *Sakata* [95] publizierte Ergebnisse für höhere Membrankonzentrationen. In Abb. 42 wurden SEM-Aufnahmen der Oberfläche einer schnell eingefrorenen PM-Suspension dargestellt.

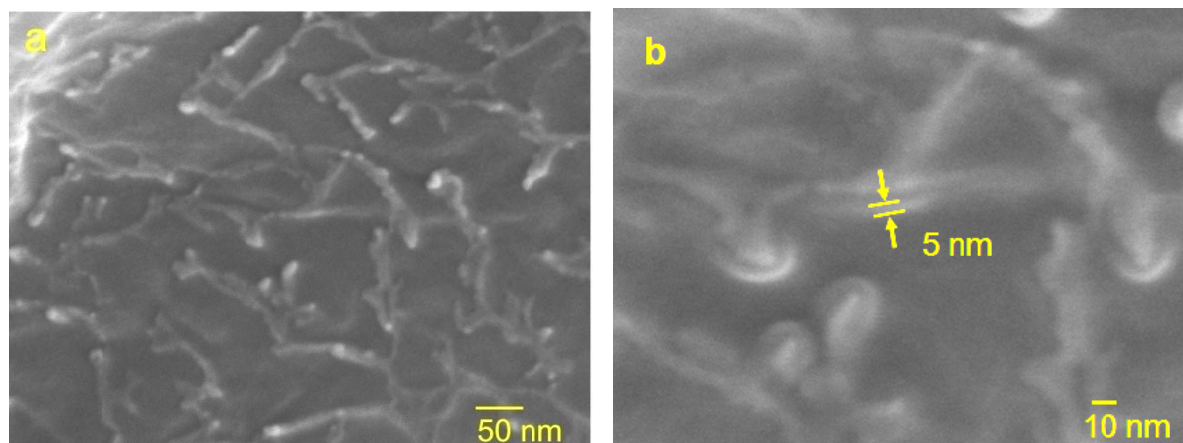


Abb. 42: SEM-Aufnahme einer schnell gefrorenen PM-Suspension. Auf Oberfläche sieht man Stirnseite von PM.

Aufgrund der hohen Gefriereschwindigkeit wurde hier keine „ice-induced“ Trocknung beobachtet und die Membranen bilden keine lamellaren Strukturen. In Abb. 42 sind die Kanten von PM gut zu erkennen, und die Dicke dieser Membranen kann zu ca. 5 nm bestimmt werden. Beide Flächen von PM sind hydrophile, während die Kanten hydrophobe sind, deswegen stehen PM senkrecht zur Suspensionsoberfläche. Dieses Ergebnis hat eine grundsätzliche Bedeutung für die Selbstorganisation von PM im Film. Bei Trocknung vergrößert sich die Konzentration von PM in einer Suspension, folglich vergrößert sich die Menge von orientierten PM in der Grenzschicht und diese Schicht dient als Matrix für den Aufbau nachfolgender Schichten. Auf diese Weise steht zu erwarten, dass bei einer Dicke des Films, die größer ist als die PM, senkrecht orientierte Filme gebildet werden. Das Vorhandensein der Orientierung von PM in der Suspension kann man in den hier gezeigten Experimenten *in situ* sehen (Abb. 28 und 29). Die erste Messung zeigt den Unterschied in den Streukurven. Das sieht man in Abb. 31. In der Suspension sind die PM senkrecht zur Wasser-Luft-Grenzfläche orientiert, stehen aber nicht parallel zueinander. Deswegen weisen bei einem Einfallswinkel im SAXS von  $90^\circ$  die PM-Schichten eine parallele Orientierung zum Röntgenstrahl auf, während bei einem Einfallswinkel von  $20^\circ$  die Membranen ungeordnet zum Strahl stehen.

Bisher wurde ein möglicher Einfluss des Substrats auf die Filmbildung und die Orientierung von PM im Film nicht diskutiert. Eines der wichtigsten Experimente für den Nachweis, dass ein Substrat keine Wirkung auf die Bildung der Struktur des Films hat, ist die Trocknung einer Suspension und die Filmbildung ohne Substrat. Wie im Kapitel 3.2.2. beschrieben ist, trocknet eine Suspension auch auf einem Metallrahmen mit Hilfe der Oberflächenspannung der Suspension. Bei den SAXS-Messungen bei einem Einfallswinkel von  $90^\circ$ - $90^\circ$  hat die Filmsuspension eine Anfangsdicke von etwa 1,5 mm und dieser Film trocknet von beiden Seiten. Die Kanten des Rahmes dienen nicht als Substrat für diese Suspension vom Verständnis her, dass ein Substrat wie eine gegenüberliegende Seite zur Trocknungsrichtung wirkt. Auf diese Weise hat die Filmsuspension eine effektive Dicke von 0,75 mm im Vergleich zu einem auf einem Substrat getrockneten Film. Zudem können und wurden solche Filme im horizontalen und vertikalen Zustand getrocknet. Die so hergestellten Filme weisen dieselbe Struktur wie Filme, die auf einem Substrat hergestellt wurden, auf. Die Streubilder beider lamellaren Strukturen (SEM, Abb. 43) sind nahezu identisch. Folglich haben ein Sedimentationsprozess

oder ein Substrat keine Wirkung auf die Orientierung der PM bei der Filmherstellung aus einer wässrigen Suspension, PM steht in den Filmen senkrecht zur Filmoberfläche.

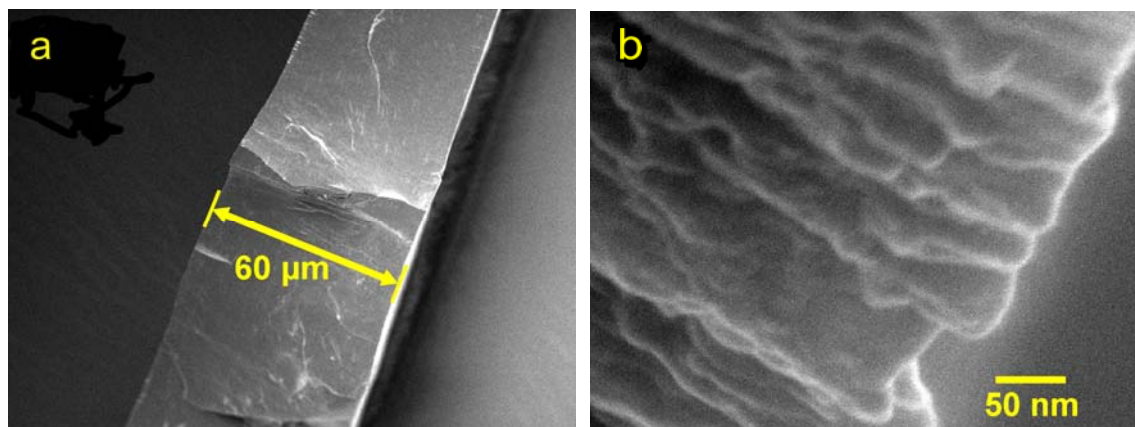


Abb. 43: SEM-Aufnahmen eines orientierten, ohne Substrat getrockneten PM-Films einer Dicke von ca. 60  $\mu\text{m}$ . Die PM stehen senkrecht zur Filmoberfläche. (a) Bruchkante in Übersicht, (b) Detailaufnahme der Bruchkante.

Aus SEM-Experimenten wurde festgestellt, dass in Suspension PM an der Wasser-Luft-Grenze eine Orientierung senkrecht zur Wasseroberfläche hat (Abb. 42), deswegen sieht man einen Streuunterschied ab der ersten SAXS-Messung während der Trocknung (90% Wassergehalt, Abb.31).

Ausgehend von dieser PM-Orientierung in Suspension kann ein Modell für den Trocknungsvorgang und die damit einhergehende Orientierung von PM im Film vorgeschlagen werden (Abb. 44). In einer Suspension weisen PM eine chaotische Verteilung außerhalb der unmittelbaren Wasser-Luft-Grenzfläche auf. In dieser Grenzschicht sind die Membranen senkrecht zur Wasseroberfläche wegen ihrer hydrophilen und hydrophoben Eigenschaften orientiert. Die PM stehen mit ihren hydrophoben Kanten senkrecht zur Wasser-Luft-Grenzfläche. Bei Trocknung konzentriert sich die Suspension, die oberste Schicht nähert sich dem Substrat und induziert die Orientierung der nächsten orientierten Schicht. Bei 55% Wassergehalt im Film stehen dann alle Membranen senkrecht zur Filmoberfläche, das wurde mit Hilfe der SAXS-Experimente gezeigt (Abb. 30). Bei einem Einfallswinkel von  $90^\circ$ - $90^\circ$  sieht man im Streubild nur das hexagonale Gitter. Die Streukurve hat gleiche Form und Intensität wie die Streukurve des getrockneten Films, das heißt, dass alle PM in der Probe eine Orientierung in eine Richtung haben, sie stehen aber nicht parallel zueinander. Bei weiterer Trocknung entsteht bei 31% Wassergehalt im Film eine stabile lamellare Struktur. Die Periodizität dieser Struktur beträgt ca. 59 Å, das entspricht vier Schichten Wassermoleküle zwischen den Membranen. Zudem tritt eine Streuisotropie bei Drehung der Probe im SAXS-Experiment um eine Achse auf, die senkrecht zur Filmoberfläche steht. Daraus lässt sich schließen, dass die PM im Film eine Nahordnung und keine Fernordnung besitzen.



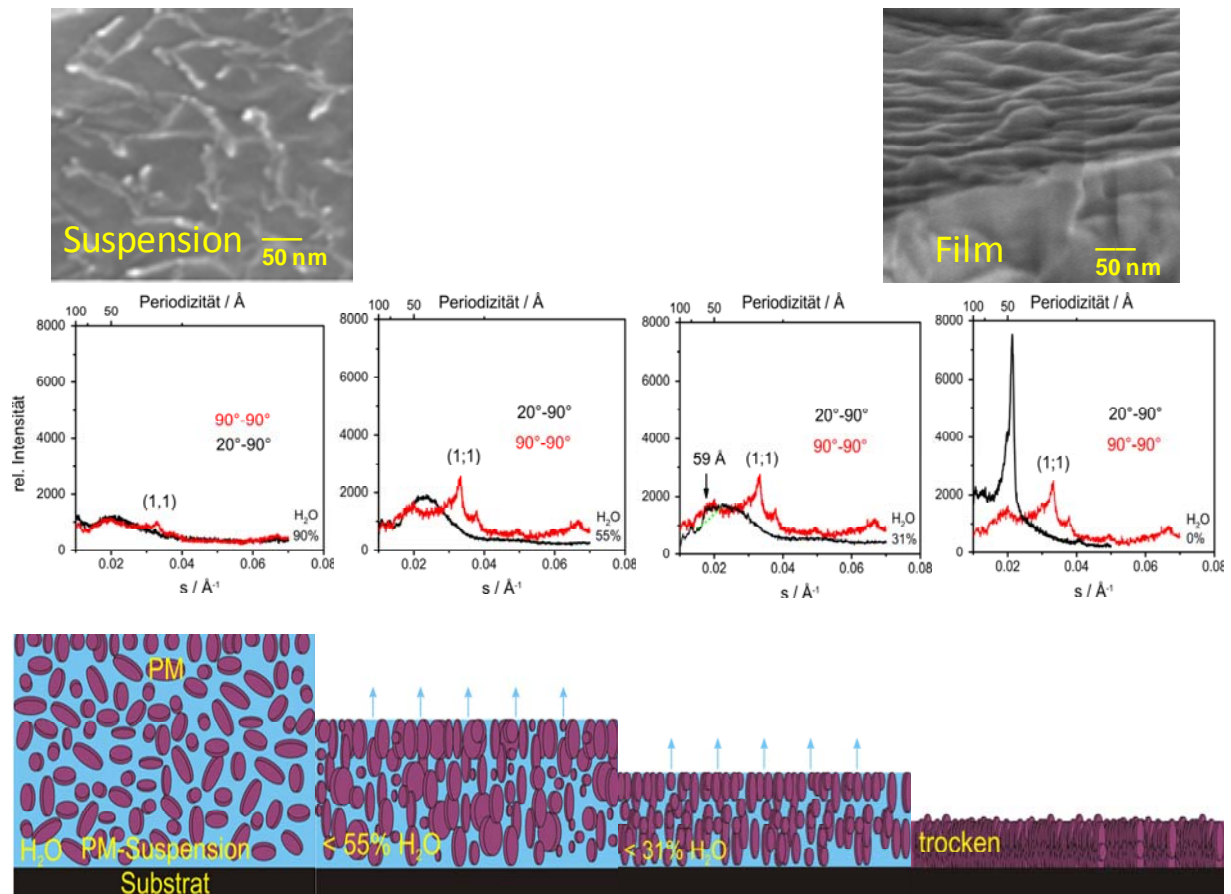


Abb. 44: Schematische Darstellung eines Modells der PM-Orientierung in Suspension beim Trocknungsvorgang.

Man kann vermuten, dass 4 Wasserschichten 2+2 Schichten sind. Dabei handelt es sich um die erste und die zweite Hydrathülle von PM. In den hier vorgestellten *in-situ*-Experimenten zeigt sich eine schwache Wechselwirkung von PM mit der zweiten Hydrathülle. Das ist in den Trocknungs- und Gefriertrocknungsexperimenten zu erkennen (s. Abb. 36).

Abb. 45 zeigt die SEM-Aufnahme eines getrockneten PM-Films, die das Resultat des hier vorgestellten Modells unterstützt. Zum einen ist an der Bruchkante des Films zu erkennen, dass die PM senkrecht zur Filmoberfläche orientiert sind. Andererseits weist diese Orientierung bei Betrachtung der Oberfläche des Films eine domänenartige Struktur auf, d.h. es gibt einige lamellare Bereiche im Film, die zueinander verdreht sind. Dies führt dann zu den bereits erwähnten Charakteristika im SAXS-Experiment.

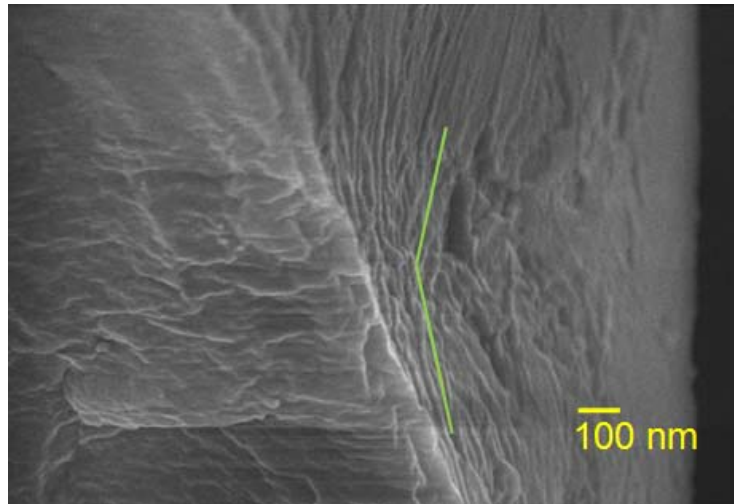


Abb. 45: SEM-Aufnahme von Bruchkante und Oberfläche eines orientierten, auf einem hydrophilen Substrat getrockneten PM-Film. Auf der Filmoberfläche sind die Stirnseiten von PM zu sehen, zudem verschiedene Domänen der lamellaren Struktur. An der Bruchkante ist die senkrechte Orientierung der PM zur Filmoberfläche erkennbar. Die Domänenrichtung wurden grüne Linien gezeigt.

### 5.3. Selbstorganisation von PM in Filmen mit Glycerin, Gelatine oder PVA

#### 5.3.1. PM-Filme mit Glycerin

Glycerin wird oft in Medizin und Biotechnologie als ein Kryoprotektor verwendet [96-100], deswegen wurden die physikalischen Eigenschaften [101-103] und die molekulare Struktur [96,98,104] seiner wässrigen Lösungen schon lange untersucht. Auch sind die Besonderheiten, die Konformationsänderungen [105,106] und die spektralen Übergänge [107,108] von BR in Gegenwart von Glycerin und die Anwendungen von Glycerin als eine Komponente in holographischen Matrices bekannt [109,110].

Im getrockneten Film aus einer wässrigen Suspension von PM mit Glycerin zeigt PM eine hexagonale Gitterstruktur (Abb. 46). Jedoch gibt es eine Verschiebung der Linien zum Bereich geringer Werte des Streuvektors  $s$ . Offensichtlich liegt dies an einer Wechselwirkung von den Glycerinmolekülen mit der Lipiddoppelschicht der Membran. Ein ähnliches Ergebnis ist bereits für die Wechselwirkung zwischen einer Lipidschicht und Glycerin bekannt [113]. Die Verschiebung zeigt eine Vergrößerung in der Einheitszelle des hexagonalen Gitters um etwa  $1,5 \text{ \AA}$ , die nicht zum Verlust der Kristallinität führt.

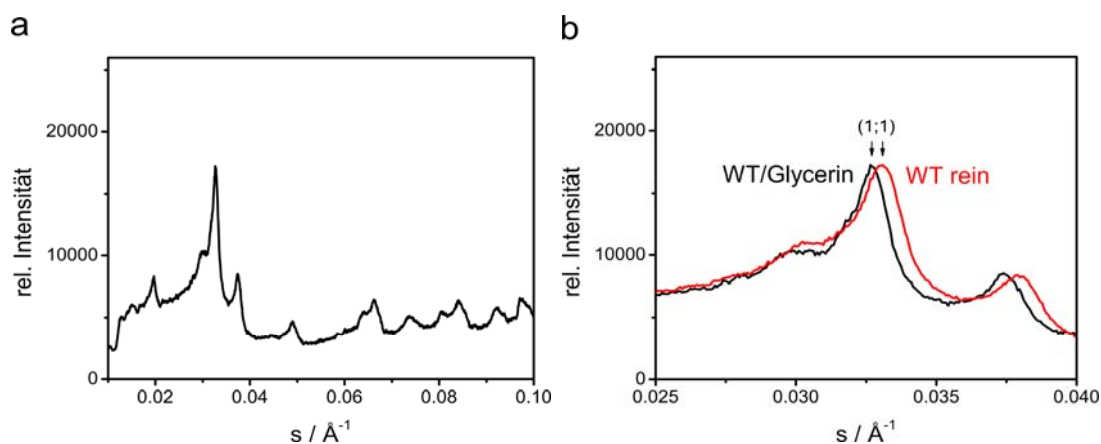


Abb. 46: (a) SAXS-Streukurve des hexagonalen Gitter eines orientierten getrockneten PM-Glycerin-Films mit einem Verhältnis PM/Glycerin 1/1, gemessen bei einem Einfallswinkel von  $90^\circ$ - $90^\circ$ . (b) Vergleich der unter Abb 1a) gemessenen SAXS-Streukurve im Bereich des (1;1)-Streusignals (schwarz) mit der eines reinen PM-WT-Films (rot).

Nach einer Lagerung des Films unter Vakuum über Nacht erfolgt eine Linienverbreiterung. Dieser Effekt entsteht wegen Veränderungen in der Tertiärstruktur von Bakteriorhodopsin bei Substitution des mit den Membranproteinen stark gebundenen Wassers durch Glycerin.[105] Die Konformationsänderungen von Bakteriorhodopsin-Molekülen führen zu ihren Orientierungsänderungen in der Lipiddoppelschicht und damit zu gewissen Störungen der hexagonalen Struktur, deswegen wird die Verbreiterung der Peaks beobachtet.[114] Diese Verbreiterung ist reversibel: bei der Befeuchtung findet der Ersatz des Glycerins durch Wasser statt, die Struktur wird wieder hergestellt und die Linien werden wieder schmaler.

Abb. 47 zeigt die progressive Zunahme des Streuvektors  $s$  für den Peak der lamellaren Struktur für PM-Glycerin-Filme mit unterschiedlichem Gehalt an Glycerin. Ihr ist zu entnehmen, dass mit zunehmendem Glyceringehalt (Massengehalt von Glycerin nimmt von 0% bis 38% zu) die Periodizität der Lamellenstruktur und folglich der Abstand zwischen den Membranen mit zunehmendem Glycerin-Gehalt in den Filmen von 47 Å (für einen Film ohne Glycerin) bis 76 Å (38%) zunimmt.

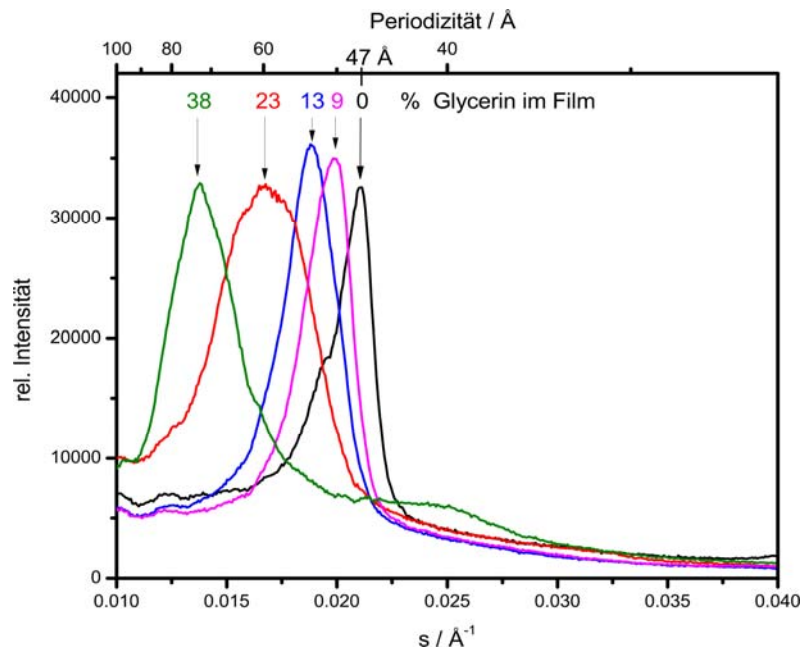


Abb. 47: SAXS-Streukurven der lamellaren Struktur orientierter getrockneter PM-Glycerin-Filme mit unterschiedlichem Massenverhältnis PM/Glycerin (von 0 bis 38% Massengehalt von Glycerin im Film) bei einem Einfallswinkel von  $20^\circ$ - $90^\circ$

Wenn die Konzentration von Glycerin im Film höher als 40% ist, dann sind die zweiten und die dritten Reflexe deutlich sichtbar (Abb. 48), deren Lagen  $s_2$  und  $s_3$  (allgemein:  $s_n = n \cdot s_1$ ) in guter Übereinstimmung mit den theoretischen Werten [115] sind.

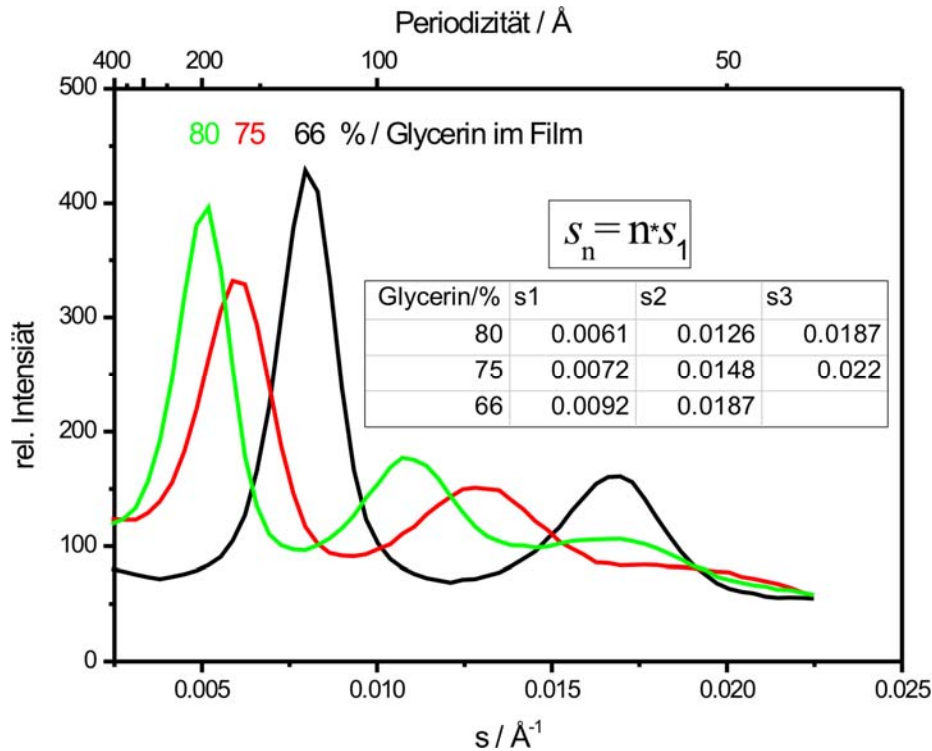


Abb. 48: SAXS-Streukurven der lamellaren Struktur eines orientierten getrockneten PM-Glycerin-Films mit unterschiedlichem Massenverhältnis PM/Glycerin (von 66% bis 80%) bei einem Einfallswinkel von 20°-90°. Die Streukurve zeigt klar zweite und dritte Reflexe. In der Tabelle wurden die Positionen der Reflexe dargestellt.

Der primäre Peak der lamellaren Struktur verbreitert sich leicht bei Zunahme der Konzentration von Glycerin in der Anfangssuspension und folglich im Film. Das findet aufgrund von leichten Fluktuationen der Lage von PM zu PM statt. Die lamellare Struktur ist jedoch – wie z.B. im Fall eines Films mit 80% Glycerin im Film (Abb. 48, grüne Kurve) – deutlich zu erkennen, zudem ist ein stark bevorzugter Abstand zwischen den PM erkennbar. Für das Beispiel 80 % Glycerin beträgt dieser ca. 150 Å, dies entspricht etwa 40 Molekülen Glycerin zwischen den PM.

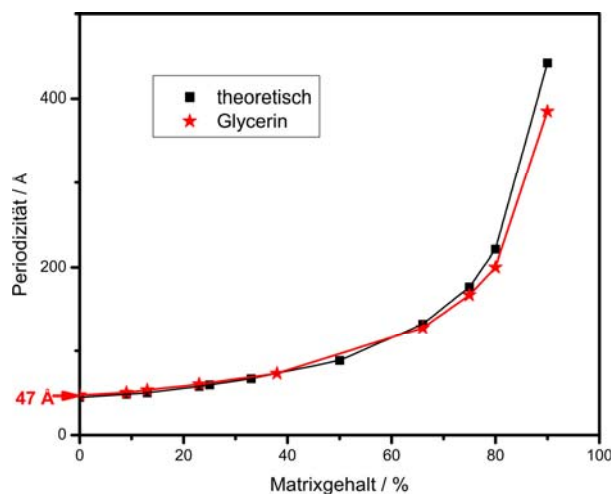


Abb. 49: Vergleich der Konzentrationsabhängigkeit der Periodizität der lamellaren Struktur in PM-Filmen mit Glycerin mit theoretischen Werten. PM/Glycerin – rote Sternchen, theoretische Werte – schwarze Quadrate.

In PM-Filmen mit Glycerin verteilen sich die PM also zu fast monomodaler Periodizität nahe den theoretischen Werten (berechnet für lateral unendliche PM, Abb. 49). Die Diskrepanz zwischen den experimentellen Daten und der theoretischen Kurve um mehr als 10% wird nur ab 80% Glyceringehalt im Film beobachtet. Diese gute Übereinstimmung kann durch die tatsächliche Größenverteilung von PM in der Probe (der typische Größenbereich von PM in den untersuchenden Proben liegt zwischen 50 nm und 400 nm) erklärt werden. In einer Probe mit unendlich großen PM gibt es keine Glycerin-Moleküle zwischen den Kanten zweier PM. Die in einer realen Probe dort liegenden Glycerin-Moleküle befinden sich in der theoretischen Probe zwischen den PM und vergrößern somit den Abstand zwischen den Membranen (Kanteneffekt). Dieser Kanteneffekt wird bei zunehmender Glycérinkonzentration von größerer Bedeutung, dies führt zu der hier gezeigten Abweichung zwischen Theorie und Experiment.

Die Auflösung getrockneten lyophilisierten PM-Pulvers in wasserfreiem Glycerin (99,5%) führt zu einer chaotischen Verteilung von PM im Film (Abb. 50). Nach einem Tag Lagerung sind die Streukurven sehr ähnlich zu Streukurven eines getrockneten Pulvers (Abb. 19), d.h. eine lamellare Struktur ist für die beiden Einfallswinkel  $20^\circ$ - $90^\circ$  und  $90^\circ$ - $90^\circ$  zu sehen wie auch der Peak (1;1). In der Probe liegen also zueinander unorientierte Stapel von PM ohne Glycerin zwischen den einzelnen Membranen vor.

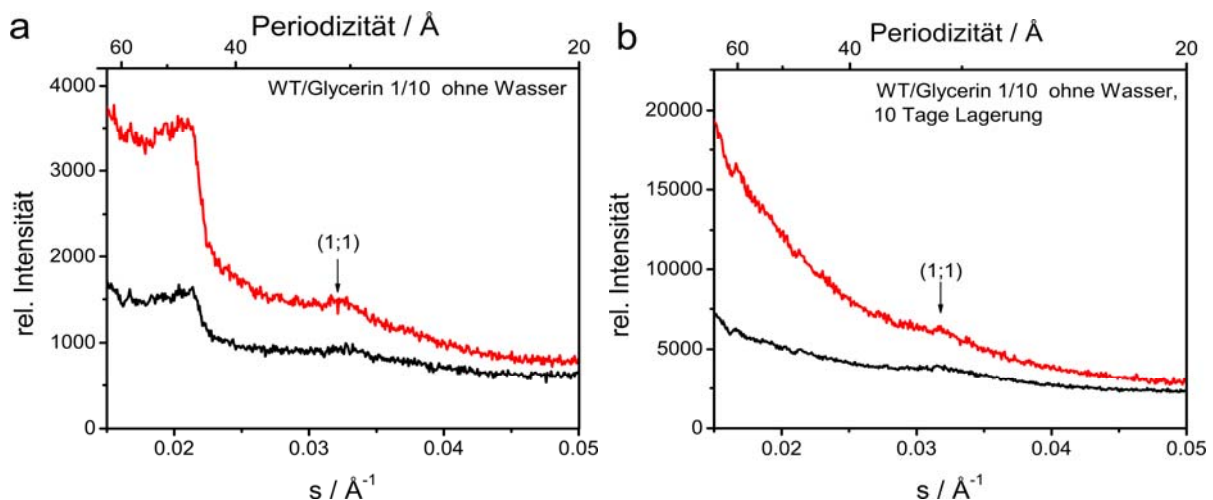


Abb. 50: SAXS-Streukurven lyophilisierter PM in einem PM-Glycerin-Film, gemessen bei zwei Einfallswinkeln:  $90^\circ$ - $90^\circ$  (schwarz) und  $20^\circ$ - $90^\circ$  (rot). (a) ohne Lagerung, (b) 10 Tage Lagerung.

Nach 10 Tagen Lagerung verschwindet der Peak der lamellaren Struktur, d. h. die PM-Stapel lösen sich auf. Danach gibt es nur stark verbreiterte Peaks (1,1) des hexagonalen Gitters. Das bedeutet, dass die Membranen im Film chaotisch orientiert sind (Lösung), und im Film gibt es keine orientierte lamellare Struktur. Folglich tritt Selbstorganisation der PM in einem Film mit Glycerin nur in Gegenwart von Wasser während des Trocknungsprozesses des Films auf.

Die Orientierung von PM bei Trocknung in PM-Glycerin-Filmen findet wahrscheinlich unter dem Einfluss der Oberfläche der Suspension statt. Bei Trocknung der Filme ohne Substrat (die PM-Suspension wurde in einem Metallrahmen aufgehängt und durch die Oberflächen-

spannung gehalten) wurden die Filme mit der gleichen bevorzugten Orientierung der PM erhalten. Der Vorgang der Selbstorganisation von PM hängt zudem nicht von der Orientierung der Filme (vertikal oder horizontal) während des Trocknungsprozesses ab, das heißt, die Bildung der Struktur ist nicht das Ergebnis der Sedimentation und der Wechselwirkung mit einem Substrat.

Wie gezeigt benötigt die Orientierung von PM die Gegenwart von Wasser. Nach der Trocknung sind die Membranen im orientierten Zustand im viskosen Glycerinfixiert. Die Anfangsorientierung der Membranen findet in der Oberflächenschicht statt. Mit der Entfernung des Wassers entsteht die Orientierung in tieferen Schichten und die Membranen bilden eine gut orientierte lamellare Struktur auch bei hohen Verhältnissen von Glycerin zu PM (bis 10/1). Im Gegensatz dazu werden stabile Lamellen in wässrigen Filmen mit einem Verhältnis von Wasser zu PM von mehr als 1/1 aufgrund der guten Beweglichkeit von PM im Wasser nicht beobachtet.

Eine Untersuchung *in situ* während der Trocknung einer wässrigen glycerinhaltigen PM-Suspension (0,5 % Glycerin in der Start Suspension) hat gezeigt, dass der Orientierungsvorgang genauso wie im Falle einer wässrigen PM-Suspension abläuft, aber der bei 31 % Wassergehalt erscheinende Peak der lamellaren Struktur verschiebt sich um 2,5 Å zu größeren Abständen hin. Diese Verschiebung liegt an der Gegenwart von Glycerin zwischen den Membranen. Bei einer solch geringen Konzentration von Glycerin im Wasser bildet Glycerin einen Clusterstruktur aus 2-3 Molekülen Glycerin und 10 Molekülen Wasser [104]. Aber diese Struktur hat auf die Selbstorganisation bei der Trocknung keinen Einfluss.

Wird der Glyceringehalt einer wässrigen Start Suspension auf 2/1 PM/Glycerin erhöht, läuft der Trocknungsprozess gleich statt. In Abb. 51 sind die SAXS-Streukurven dieser Probe bei einem Einfallswinkel von 90°-90° gezeigt. Bei ca. 52% Wassergehalt im Film besitzt die Streukurve die gleiche Form und Intensität wie die Streukurve des getrockneten Filmes. Dieses Ergebnis wurde hier bereits für Filme aus wässriger Suspension beschrieben, bei diesem Wassergehalt sind die PM senkrecht zur Filmoberfläche orientiert. Glycerin scheint auf die Orientierung der PM keinen Einfluss zu nehmen, folglich kann im weiteren Rahmen dieser Arbeit Glycerin als inerte Matrix für PM betrachtet werden.



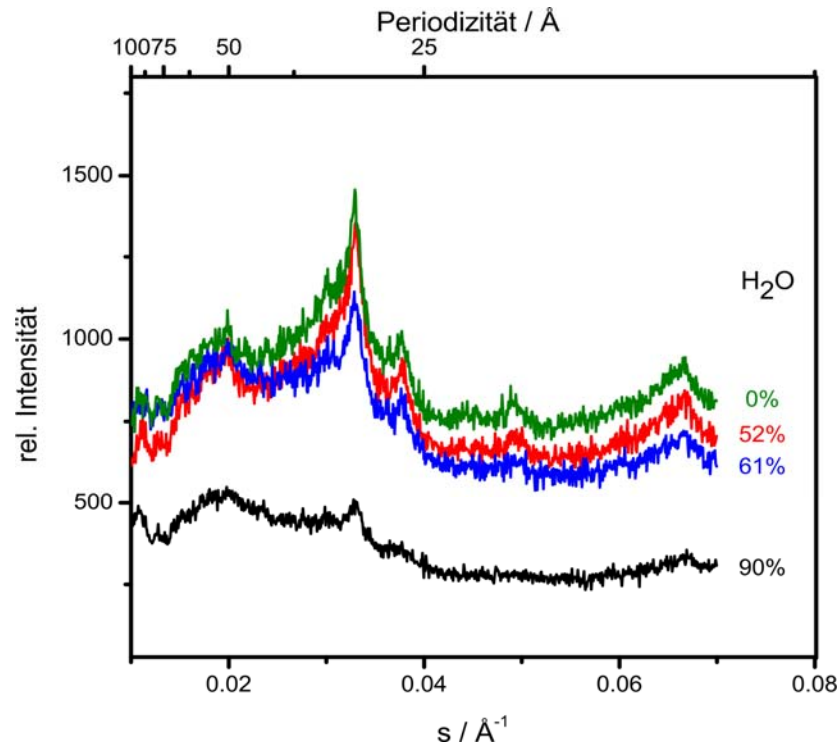


Abb. 51: SAXS-Streukurven von eines PM/Glycerin-Films bei Trocknung mit einem Wassergehalt von 90 bis 0%, gemessen bei einem Einfallswinkel von  $90^\circ$ - $90^\circ$ .

Zur besseren Verständnis der Prozesse bei den Selbstorganisationsprozessen in PM-Glycerin-Filmen wird im Folgenden die Viskosität der Proben betrachtet. Der Wassergehalt im Film nach Trocknung der PM-Glycerin-Filme beträgt bei den Präparationsbedingungen der Filme etwa 10 % [111,112]. Abb. 52 zeigt den Verlauf der Viskosität von wässrigen Glycerinlösungen von 0 bis 90 % Glycerin. Zunächst wird ein Film mit niedrigem Anfangsgehalt an Glycerin in der Suspension (PM/Glycerin 10/1) betrachtet. Die Viskosität einer 0,5%igen Lösung von Glycerin in Wasser beträgt ca. 1,0 cP und ändert sich bis zu einem Glyceringehalt von 1% (dies entspricht einem 55%igen Wassergehalt, wobei sich hier der Wassergehalt immer auf das Verhältnis von Wasser zu PM bezieht, in diesem Film) fast nicht (1,06 cP).

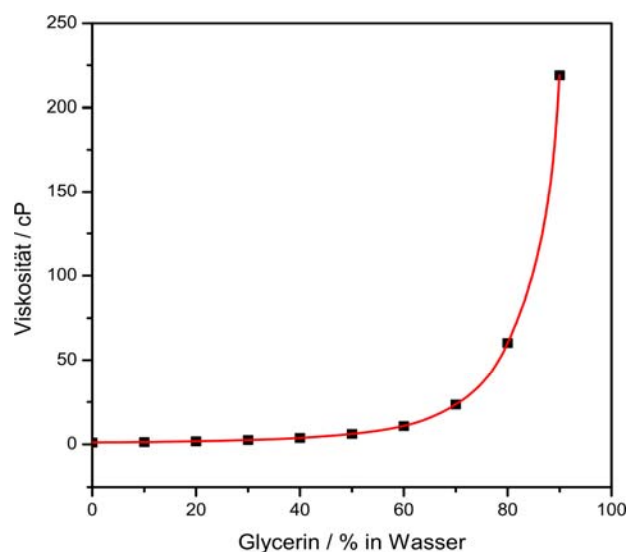


Abb. 52: Konzentrationsabhängigkeit der Viskosität der wässrigen Lösung von Glycerin.[101]

Folglich findet die Orientierung von PM unter den gleichen Bedingungen wie in rein wässriger Suspension statt. Bei größeren Werten des Glyceringehalts ändert sich die Viskosität bei der Trocknung stark: bei einem Verhältnis PM/Glycerin von 1/1 und mehr besitzt die Probe eine höhere Viskosität, z.B.: bei 55% Wassergehalt im Film hat diese Probe eine Viskosität ca. 6 cP und eine Probe mit dem Verhältnis PM/Glycerin 1/4 schon eine Viskosität von 60 cP. Dennoch werden auch für hohe Anfangskonzentrationen an Glycerin orientierte, lamellare Filme im System PM-Glycerin-Wasser bei Trocknung erhalten.

Eine gleichmäßige Verteilung von PM in den Filmen wird möglicherweise durch die gegenseitige Abstoßung der negativ geladenen Membranen erreicht. Somit sind zwei Effekte zu beobachten: die Bildung der bevorzugten Orientierung der Membranen bezüglich der Filmoberflächen sowie die Bildung einer stabilen Lamellenstruktur, also die gleichmäßige Verteilung von PM in den Filmen mit Glycerin. Die Stabilität der lamellaren Struktur ist wahrscheinlich eine Folge der hohen Viskosität von Glycerin und daher der geringer Beweglichkeit von PM im Film.

Nach derzeitigem Kenntnisstand ist erstaunlich, dass sich PM in Filmen mit Glycerin nicht nur zu fast monomodaler Periodizität verteilen, sondern auch eine bevorzugte Orientierung haben. Wie schon gezeigt wurde: ein Substrat und eine Sedimentation haben keine Wirkung auf die Selbstorganisation von PM in Filmen. Auch ist es nicht sehr wahrscheinlich, dass die Diffusion von Wassermolekülen zur Oberfläche bei Filmtrocknung die Orientierung von PM im Film beeinflusst. Der Abstand zwischen den Membranen in Filmen mit Glycerin ist viel größer als einzelne Wassermoleküle, deswegen sind die „Kanäle“ zwischen den PM (auch bei abnehmendem Wassergehalt während der Trocknung) für die Diffusion so groß, dass diese die PM insbesondere bei kleinen Trocknungsgeschwindigkeiten wahrscheinlich nicht beeinflussen. Folglich hat es einen Sinn über zwei Prozesse bei der Filmbildung zu sprechen: einen Orientierungs- und einen Bildungsprozess. Der Orientierungsprozess beginnt mit der Wechselwirkung von PM mit der Wasser-Luft-Grenzfläche, die PM stehen senkrecht zu ihr. Der Bildungsprozess beruht auf der Wechselwirkung zwischen den PM an der Grenzfläche und PM des Volumens der PM-Suspension bei Trocknung.

### 5.3.2. PM-Filme mit Gelatine

Gelatine ist derzeit eine der am häufigsten genutzte Matrices für holografische Filme, aber die Filmbildung ist wegen ihrer komplexen Zusammensetzung und der großen Anzahl an Zuständen unter verschiedenen Erstarrungsbedingungen [110,116,117,119] nicht sehr gut untersucht. Die Fähigkeiten von Gelatine zur Bildung eines dreidimensionalen Gitters bei Erstarrung [117] und die Wirkung als Schutzkolloid sowie die Verhinderung des Ausflocken suspendierter Teilchen mit Hilfe von Gelatine sind gut bekannt [118], aber die Beschreibung dieser Effekte hat empirischen Charakter und ist derzeit theoretisch nicht verstanden. Deswegen wurden im Rahmen dieser Arbeit die Mechanismen der Bildung von Gelatinefilmen nicht untersucht, aber die Gesetzmäßigkeiten des Verhaltens von PM im Film wurden beobachtet.

SAXS-Messungen (Abb. 53a) zeigen, dass in einem PM-Film mit Gelatine PM die Kristallinität behält. Bei einem Einfallswinkel von  $90^\circ$ - $90^\circ$  zeigt die Probe die Streukurve des hexago-

nenen Gitters mit schmalen Banden, und unter  $20^\circ$ - $90^\circ$  ist nur das Streusignal der lamellaren Struktur zu erkennen. Das bedeutet, dass die Membranen parallel zueinander orientiert sind und eine lamellare Struktur ausbilden. Eine SEM-Aufnahme der Bruchkante eines getrockneten PM-Gelatine-Films (PM/Gelatine 1/1, Abb. 53b) zeigt, dass die Membranen flach übereinander liegen.

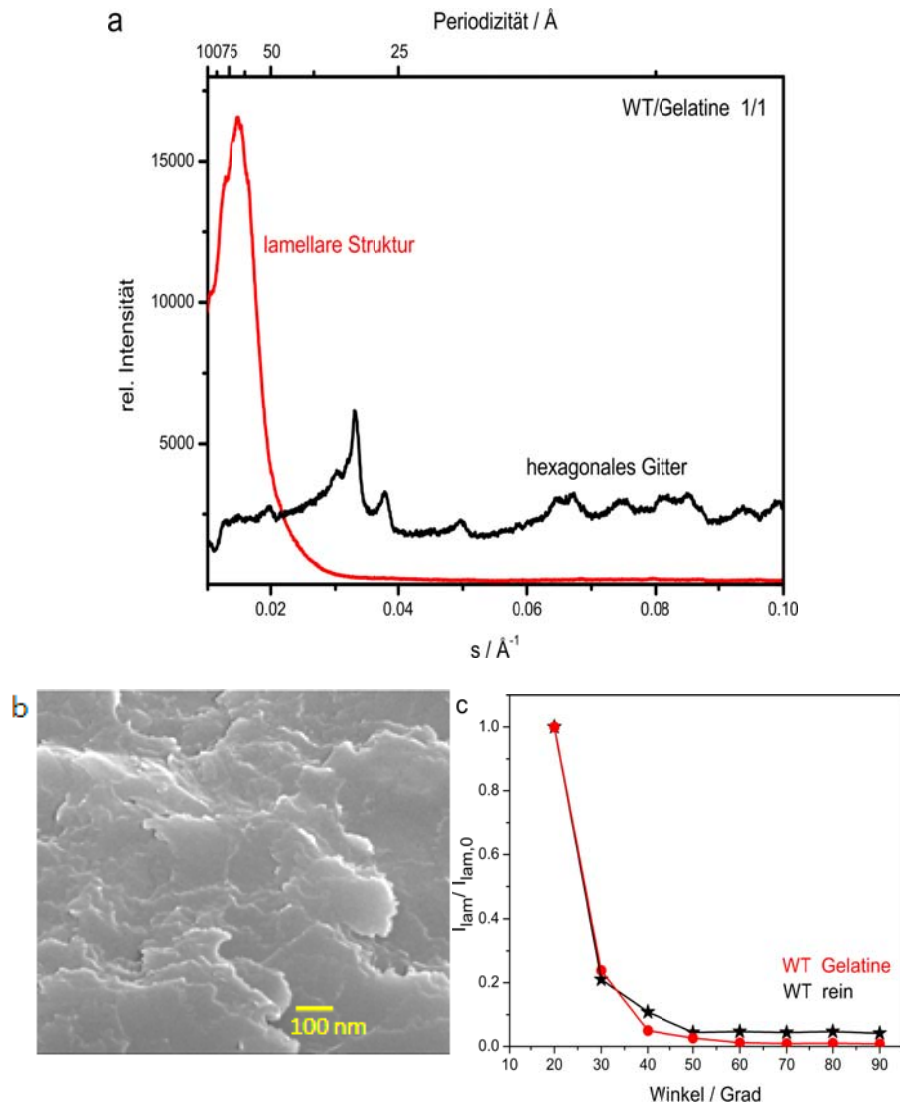


Abb. 53: (a) SAXS-Streukurve des hexagonalen Gitters und der lamellaren Struktur eines orientierten getrockneten PM/Gelatine-Films mit einem Verhältnis von PM/Gelatine 1/1, gemessen bei zwei Einfallswinkeln:  $90^\circ$ - $90^\circ$  (schwarz) und  $20^\circ$ - $90^\circ$  (rot). (b) SEM-Aufnahme eines orientierten getrockneten PM/Gelatine-Films (PM/Gelatine 1/1). (c) Abhängigkeit der normierten Intensitäten des lamellaren Peaks vom Einfallswinkel  $\alpha$ - $90^\circ$ . PM/Gelatine-Filme (rote), PM rein (schwarze Sternchen).

Der schmale Peak des hexagonalen Gitters und die Abwesenheit der lamellaren Struktur bei  $90^\circ$ - $90^\circ$  ist – wie schon für andere Filme in dieser Arbeit gezeigt wurde – ein Kennzeichen für die Orientierung der Membranen im Film. Die Abhängigkeit der Streuintensität vom Einfallswinkel (Abb. 53c) entspricht der eines orientierten PM-WT-Films. Beide Filme weisen daher vermutlich die gleichen Strukturen bezüglich PM auf.

Der Peak der lamellaren Struktur ist breiter als im Fall von reiner PM, weil die Abstände zwischen PM in den Lamellen nicht gleich sind. Mit zunehmendem Gehalt von Gelatine in den

Filmen verschiebt sich dieser Peak zudem in den Bereich kleinerer Werte des Streuvektors  $s$ , d.h. der Abstand zwischen den Membranen vergrößert sich. Die Abhängigkeit der Periodizität der lamellaren Struktur von der Gelatinekonzentration im Film (Abb. 54) weist eine andere Form im Vergleich zu den Filmen mit Glycerin auf.

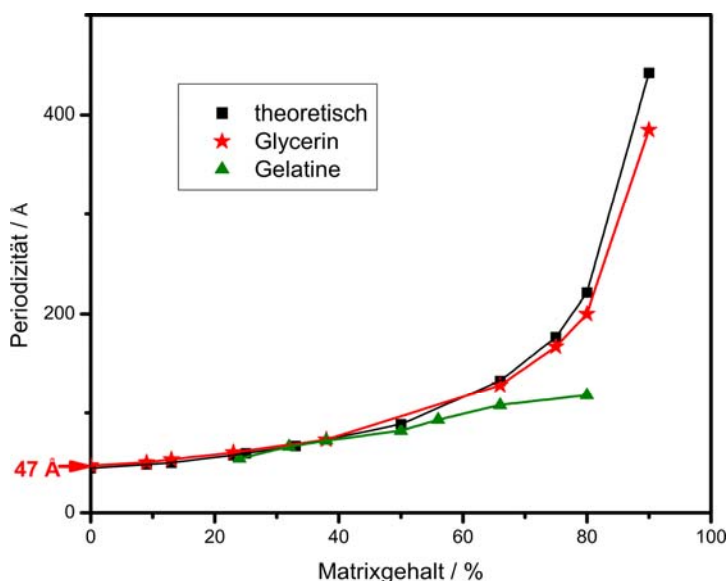


Abb. 54: Vergleich der Konzentrationsabhängigkeit der Periodizität der lamellaren Struktur in PM-Filmen mit Glycerin oder Gelatine (Matrices) mit theoretischen Werten. PM/Glycerin – rote Sternchen, PM/Gelatine – grüne Dreiecke, theoretische Werte – schwarze Quadrate.

Ab einer Konzentration von 50% weicht diese Abhängigkeit für Gelatine von der des Glycerins und den theoretischen Werten ab. Diesen Effekt kann man sich durch die Entstehung einer Adsorptionshülle aus Gelatine um PM herum erklären. Gelatine bildet eine Hülle um die Membran mit einer Dicke bis zu ca. 30 Å. Bei weiterer Erhöhung der Konzentration von Gelatine vergrößert sich die Hülle nicht. Die restliche Gelatine befindet sich wahrscheinlich außerhalb von PM-Gelatine-Lamellen und beeinflusst die Periodizität in den Lamellen daher nicht. Die Orientierung und Verteilung der PM in Filmen mit Gelatine Typ A, welche hier ausschließlich zum Einsatz kam, haben in den Experimenten hier eine gute Reproduzierbarkeit im Bereich neutraler pH-Werte der Ausgangssuspensionen. Für andere Gelatintypen und in anderen Bereichen der pH-Werte können die Ergebnisse völlig anders aussehen.

Bei einer Temperatur mehr als 35°C befindet sich Gelatine im Solzustand, bei niedrigeren Temperaturen im Gelzustand. [110] Hier wurden die PM-Gelatine-Filme derart präpariert, dass Gelatine im Solzustand vorlag. Während der Trocknung (bei Raumtemperatur) bildet die nicht der Hülle um die PM gebundene Gelatine ein Gel. Im Solzustand sind die Gelatinemoleküle in Abhängigkeit von Temperatur und Konzentration frei beweglich, im Gelzustand sind sie raumnetzförmig miteinander verbunden. Folglich bildet die nicht um PM gebundene Gelatine bei Raumtemperatur ein dreidimensionales Netz, in dem sich, umgeben von der Gelatinehülle, orientierte Membranen befinden. Die Beweglichkeit von PM in diesem Netz ist stark eingeschränkt, deswegen behalten die Membranen während der Trocknung ihre Anfangsorientierung.

Im Solzustand liegen Gelatinemoleküle in wässriger Lösung bei 35°C als Fibrillen vor, während sie bei 55°C meistens globular vorliegen.[110] Diese beiden verschiedenen Strukturen von Gelatinemolekülen wirkt sich unterschiedlich auf die Bildung der Hülle um PM aus. Bei der Präparation von PM-Gelatine-Filmen mit einem Verhältnis von PM/Gelatine von 1/4 bei 35°C, 50°C oder 60°C wurden unterschiedliche Ergebnisse beobachtet (Abb. 55). Wie schon gezeigt wurde, weist ein PM-Gelatine-Film, der aus einer bei 35°C hergestellten Ausgangssuspension präpariert wurde, eine bevorzugte Orientierung der PM und eine lamellare Struktur von PM (Abb. 55a, rote Kurve) auf. Aus Suspensionen bei 50°C wurden orientierte Filme erhalten (Abb. 55a, blaue Kurve), die eine andere Periodizität der lamellaren Struktur im Vergleich zu ersterer haben. Der Peak der lamellaren Struktur ist sehr breit und verschiebt sich in den Bereich kleinerer Werte des Streuvektors  $s$ . Das lässt sich durch eine Vergrößerung der Hülle um PM erklären und ist vermutlich das Ergebnis der beginnenden Bildung der globularen Gelatinestruktur. Bei Erhöhung der Temperatur während der Vorbereitung der Probe (bis 60°C) verschwindet schließlich der Peak der lamellaren Struktur des PM-Gelatine-Films (Abb. 55a, grüne Kurve), aber PM ist in diesen Filmen auch in einer Raumrichtung orientiert, wie bei SAXS-Messung unter den Einfallswinkeln 20°-90° und 90°-90° (Abb. 55b) zu erkennen ist. Unter 20°-90° ist keine lamellare Struktur sichtbar, während die hexagonale Struktur der PM unter dem Winkel 90°-90° ein deutliches Streubild liefert. Unter diesen Präparationsbedingungen, d. h. wenn Gelatine in globulärer Form vorliegt, bildet sich keine periodische, lamellare Struktur.

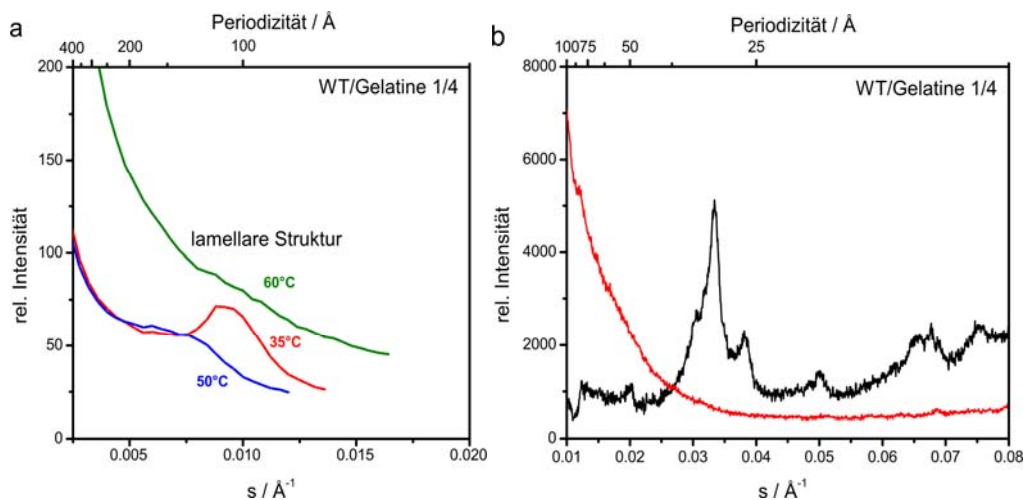


Abb. 55: (a) SAXS-Streukurven, gemessen im Bereich der lamellaren Struktur bei einem Einfallswinkel von 20°-90°, orientierter, getrockneter PM/Gelatine-Filme mit einem Massenverhältnis PM/Gelatine 1/4. Die Temperatur der Ausgangssuspensionen betragen 35°C (grün), 50°C (rot), oder 60°C (blau). (b) SAXS-Streukurve des hexagonalen Gitters (schwarz, Einfallswinkel 90°-90°) und der lamellaren Struktur (rot, Einfallswinkel 20°-90°) eines orientierten getrockneten PM/Gelatine-Films mit einem Verhältnis PM/Gelatine 1/4, hergestellt aus einer bei 60°C präparierten Ausgangssuspension (vgl. grüne Kurve in Abb. 55a).

Es wurde gezeigt, dass bei Trocknung wässriger Suspensionen von PM in Gegenwart von Gelatine bei einer Temperatur der Ausgangssuspension von 35°C und bei einem Verhältnis PM/Gelatine von 1/1 die Membranen im getrockneten Film eine periodische, lamellare Struktur bilden und eine bevorzugte Orientierung aufweisen. Dazu wurde die Ausgangssuspension

werde mit Hilfe von Ultraschall homogenisiert, auch musste die Temperatur nicht erhöht oder Tenside zugesetzt werden.

Eine Erhöhung der Temperatur der Ausgangssuspension führt dazu, dass die getrockneten Filme keine periodische, lamellare Struktur mehr ausbilden, allerdings weist die PM in diesen Filmen eine Vorzugsorientierung in eine Raumrichtung auf.

### 5.3.3. PM-Filme mit PVA

Seit etwa zwei Jahrzehnten werden PM-Filme mit PVA als Matrix für die Bestimmung der Struktur von BR [120], zur Bestimmung der Thermostabilität [121] und des Dipolmoments [135] von PM, zur Messung der Photospannung von PM und des Photozyklus von BR [122-128], sowie als Material für technische Anwendungen von PM für die Datenspeicherung [129-134] untersucht. Die Struktur von PM-PVA-Filmen wurde bisher jedoch nur in [26] untersucht.

SAXS-Untersuchungen an PM-PVA-Filmen zeigen zunächst dieselben Charakteristika wie PM-Filme ohne Zusatz von Matrixmaterialien (Abb. 56a für einen Film mit einem PM/PVA-Verhältnis von 1/1). Bei einem Einfallswinkel von  $90^\circ$ - $90^\circ$  sind nur die schmalen Peaks der hexagonalen Struktur zu erkennen (schwarze Kurve), während unter einem Einfallswinkel von  $20^\circ$ - $90^\circ$  eine Streukurve für eine lamellare Struktur erhalten wird (rote Kurve), die sogar den Reflex zweiter Ordnung zeigt. SEM-Untersuchungen (Abb. 56b) zeigen, dass die PM-Filme mit PVA eine Struktur mit großen Poren und dicken (im Vergleich zur Dicke einer einzelnen PM) Schichten haben, dabei wiesen die Membranen eine bevorzugte Orientierung auf. Während die genaue Struktur aus den SEM-Messungen nicht eindeutig zu klären ist, kann diese aber aus den SAXS-Messungen geschlossen werden, denn wie schon erwähnt zeigen die Streukurven bei einem Einfallswinkel  $90^\circ$ - $90^\circ$  nur das hexagonale Gitter und bei  $20^\circ$ - $90^\circ$  schmale Peaks der lamellare Struktur (Abb. 56a), zudem stimmt die Abhängigkeit der normierten Streuintensität vom Einfallswinkel des Röntgenstrahls mit der für orientierte PM-Filme ohne Matrixmaterial überein (Abb. 56c).

Die Periodizität der lamellaren Struktur beträgt  $47 \text{ \AA}$  (Abb. 56a) und ist damit genauso groß wie in einem Film aus reinem PM, das bedeutet, dass sich PVA außerhalb der PM-Stapel im Film befinden muss. Dasselbe Ergebnis zeigen Messungen an PM-PVA-Filmen, die mit den PM-Mutanten D96N oder D85T hergestellt wurden. Diese Periodizität wird durch den Gehalt an PVA in der Ausgangssuspension ebenfalls nicht beeinflusst (Abb. 57) sondern bleibt für einen PVA-Gehalt bis 67 % konstant. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu Literaturdaten [26]. Dieser Widerspruch lässt sich wahrscheinlich durch die unterschiedlichen Probenpräparationstechniken erklären.



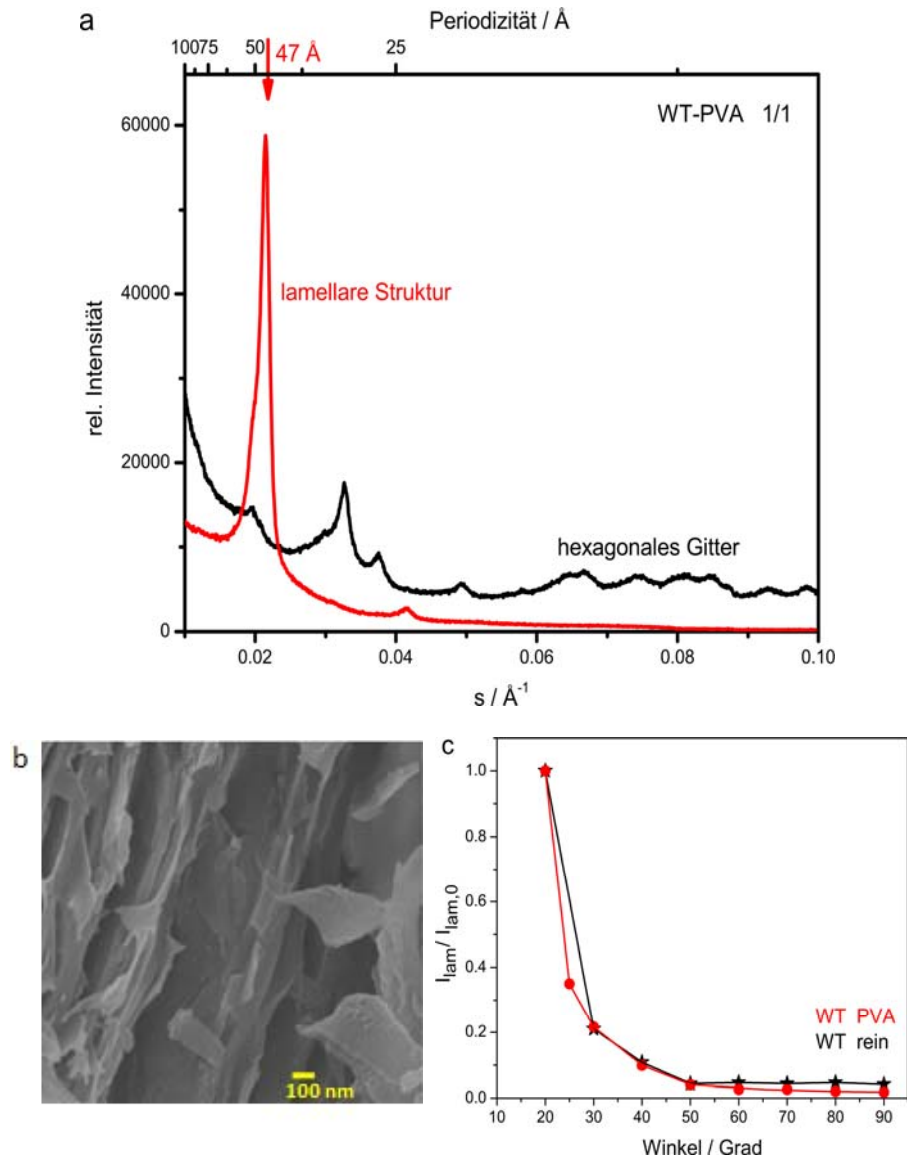


Abb. 56: (a) SAXS-Streukurve des hexagonalen Gitters (Einfallswinkel  $90^\circ$ - $90^\circ$ , schwarze Kurve) und der lamellaren Struktur (Einfallswinkels  $20^\circ$ - $90^\circ$ , rote Kurve) eines orientierten getrockneten PM/PVA-Films mit einem Verhältnis PM/PVA 1/1. (b) SEM-Aufnahme eines orientierten getrockneten PM/PVA-Films desselben PM/PVA-Verhältnisses. (c) Abhängigkeit der normierten Intensitäten des lamellaren Peaks ( $I_{\text{lam}}/I_{\text{lam},0}$ ) vom Einfallswinkel  $\alpha$ - $90^\circ$ . PM/PVA-Filme (rote Punkte), PM rein (schwarze Sternchen).



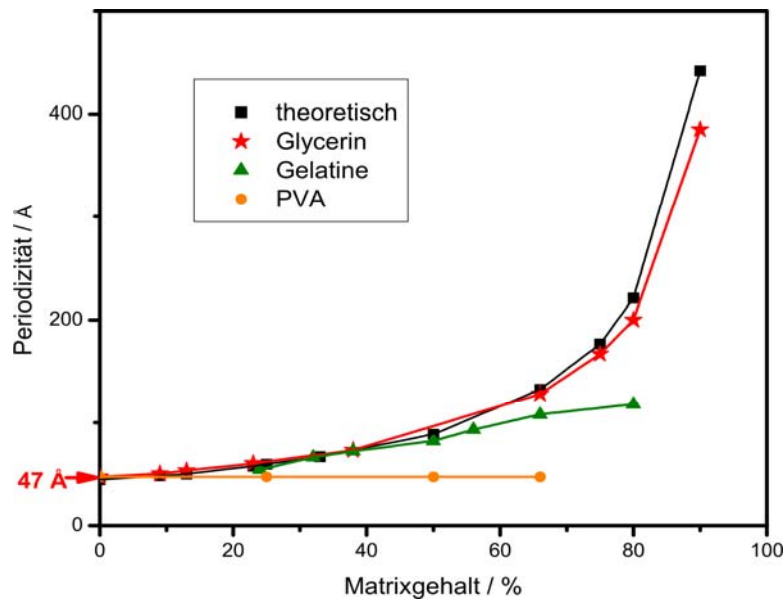


Abb. 57: Vergleich der Konzentrationsabhängigkeit der Periodizität der lamellaren Struktur in PM-Filmen mit Glycerin, Gelatine oder PVA (Matrices) mit theoretischen Werten. PM/Glycerin – rote Sternchen, PM/Gelatine – grüne Dreiecke, PM/PVA – orangene Punkte, theoretische Werte – schwarze Quadrate.

Es steht zu vermuten, dass für die lamellare Struktur und die Orientierung der PM in PM-PVA-Filmen wie im Falle reiner PM-Filme die Grenzfläche Luft-Suspension als Ausgangspunkt dient. Die Bildung von Poren während des Trocknungsprozesses ist bisher nicht verstanden.

### Zusammenfassung von Kapitel 5.3.

In einigen Veröffentlichungen [128,136] wurden die Eigenschaften von mit Gelatine oder PVA hergestellten PM-Filmen verglichen, ohne dass dabei die Struktur dieser Filme berücksichtigt wurde. In diesem Kapitel wurden die unterschiedlichen Verteilungen von PM in Filmen mit direktem Kontakt zwischen den Membranen (PM-PVA-Filme) oder ohne Kontakt (PM-Glycerin- und PM-Gelatine-Filme) gezeigt. Dies ist für das weitere Verständnis der Eigenschaften von PM-Filmen von Bedeutung. PM bilden bei der Trocknung mit Glycerin, Gelatine und PVA verschiedene lamellare Strukturen, aber alle Filme zeigen die gleiche bevorzugte Orientierung. In dieser Arbeit wurde die Selbstorganisation (Orientierung und Verteilung) von PM bei Trocknung in Gegenwart dieser Stoffe beobachtet, ohne dabei die Wechselwirkung von PM mit diesen Substanzen zu untersuchen, die oft als Matrices für PM-Filme für verschiedene technische Anwendungen verwendet werden.

#### 5.4. Kristallinität von PM D85T

In diesem Kapitel wird gezeigt, wie eine einzelne Punktmutation im Inneren von BR die 2D-Kristallstruktur von PM in Abhängigkeit von physikalisch-chemischen Bedingungen beeinflusst. In der BR Variante D85T, bei der der primäre Protonenakzeptor Asparaginsäure 85 durch Threonin ersetzt ist, wird aus BR eine Chloridpumpe [59,66]. Durch Röntgenkleinwinkelstreuung wird gezeigt, dass sich die unter den meisten Bedingungen nicht kristalline PM-D85T zu einem hoch geordneten hexagonalen 2-D kristallinen Zustand umwandelt, sobald die physikalisch-chemischen Bedingungen die Chloridbindung von BR-D85T begünstigen, d.h. wenn der pH-Wert unter pH 6 die Chloridkonzentration über 2M betragen. Das hier vorgestellte Modell erklärt die Kristallisationstendenz von PM-D85T mit Konformationsänderungen auf der Ebene einzelner BR-D85T Moleküle.

In Abb. 58 werden SAXS-Ergebnisse von aus wässriger Suspension erhaltenen PM-Filmen bei neutralen pH-Wert gezeigt.

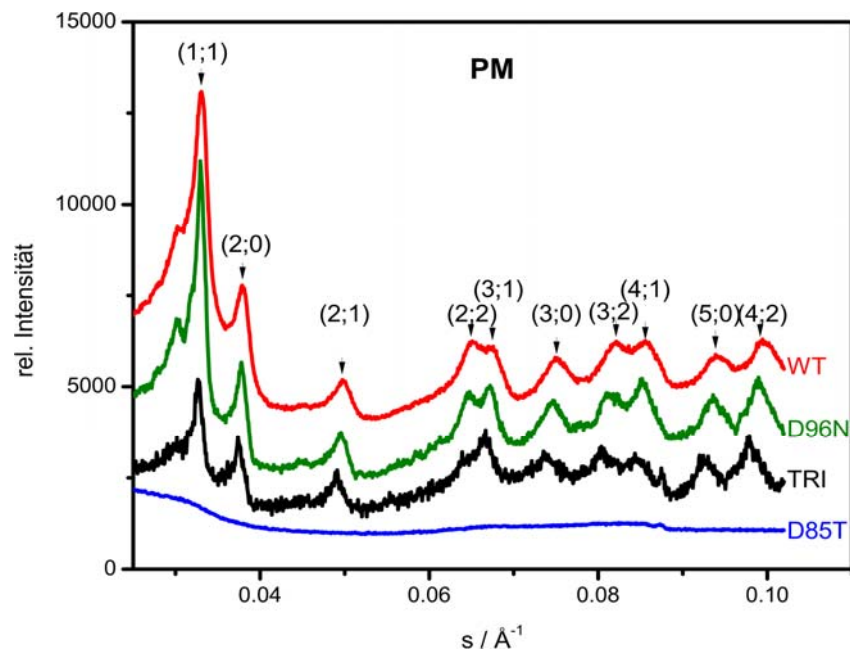


Abb.58: SAXS-Streukurvenorientierter PM-Filme bestehend aus verschiedenen PM-Mutanten (D96N, D85T und Trimutante) oder aus Wildtyp-PM (WT). Die Filme wurden jeweils aus wässriger Suspension erhalten.

Im Unterschied zu verschiedenen PM-Varianten weist PM-D85T unter den SAXS-Messbedingungen (Raumtemperatur, etwa 1 mbar) kein hexagonales Gitter auf (blaue Kurve in Abb. 58). Es ist bekannt, dass PM-WT bei 80°C einen Phasenübergang in eine weniger geordnete Struktur besitzt [114,148-150]. Um zu untersuchen, ob PM-D85T einen ähnlichen Phasenübergang aufweist und dies eventuell schon unterhalb von Raumtemperatur, was zur Folge hätte, dass das Fehlen der hexagonalen Struktur nach Abb. 58 diesem Phasenübergang zuzuschreiben wäre, wurden DSC-Messungen gefriergetrockneter PM-WT und PM-D85T durchgeführt.

Aus den DSC-Messungen wurde die Temperaturabhängigkeit der Wärmefluß von PM-WT und PM-D85T erhalten. Beide Proben zeigen einen Phasenübergang nahe bei 80°C, mithin kann ausgeschlossen werden, dass PM-D85T nicht aufgrund der Messtemperatur in der Kratky-Kamera nichtkristallin ist. (Abb. 59)

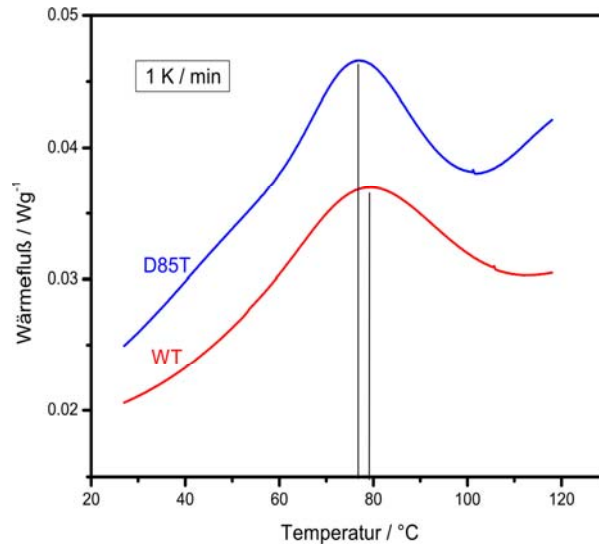


Abb. 59: Temperaturabhängigkeit der Wärmefluß von gefriergetrockneten Purpurmembranen wurde mittels DSC gemessen.

Das Streubild ändert sich in Gegenwart von Chlorid-Ionen (1 M) bei Änderung des pH-Wertes in der Suspension, aus dem die Filme hergestellt werden (Abb. 60). Im Falle des Wildtyps ist beim Übergang von pH 6 über pH 4 nach pH 2 keine Änderung in den SAXS-Spektren zu erkennen, die durch die Kristallstruktur hervorgerufenen Signale sind deutlich zu erkennen.

Anders verhält sich dies bei Filmen aus PM-D85T. Während bei pH 6 im SAXS-Spektrum keine Signale aufgrund eines Kristallgitters zu sehen sind, ist schon bei pH 4 die Streuung des hexagonalen Gitters erkennbar, und bei pH 2 entsteht eine normale Streukurve für die hexagonale Struktur, die mit der Streukurve von PM-WT übereinstimmt.

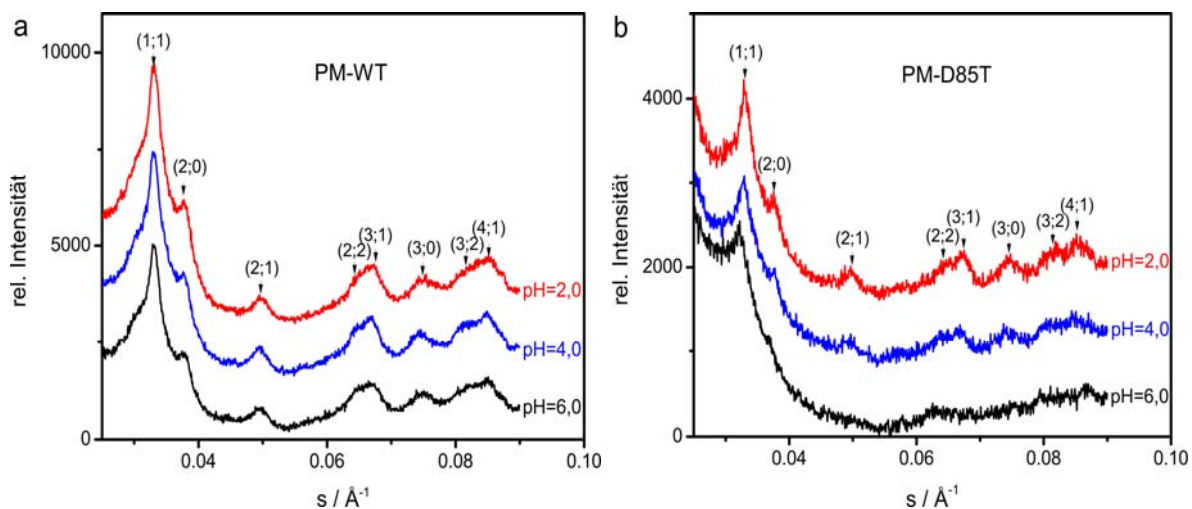


Abb. 60: Charakteristische SAXS-Streukurven von PM-Filmen für die pH-Werte 2, 4 und 6 bei einer Chlorid-Konzentration von 1 M (a) gemessen an PM-WT, (b) gemessen an PM-D85T (s.a. Abb. 6).

Wie Abb. 60a und 61 (rote Kurve) zeigen hat die Chlorid-Konzentration in der PM-Suspension keinen Einfluss auf die Gitterstruktur von PM-WT. Anders ist dies für PM-D85T, wie in Abb. 61 dargestellt. In dieser Abbildung sind die Streukurven der aus Puffer-Suspensionen bei pH 2 erhaltenen PM-Filme aus D85T mit und ohne Zusatz von Chlorid-Ionen und aus WT ohne Zusatz von Chlorid gezeigt.

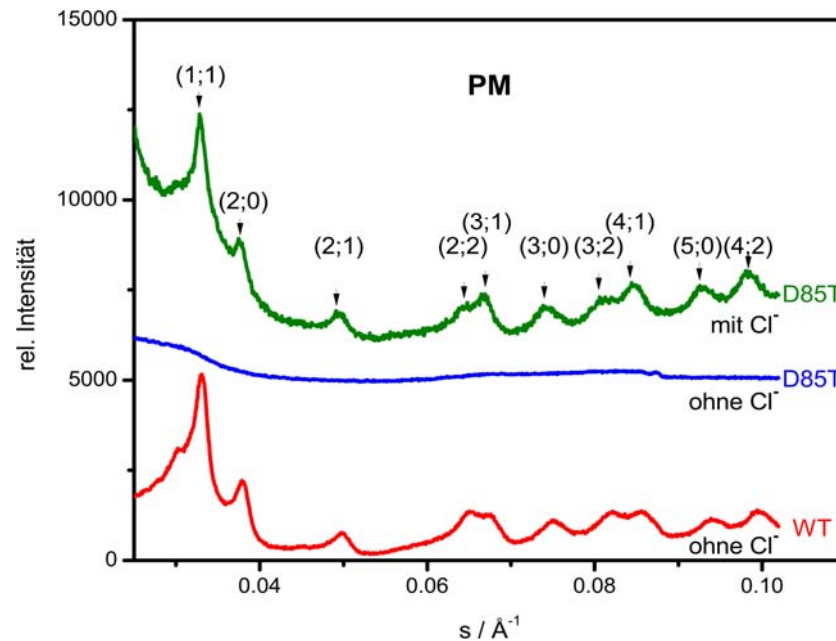


Abb. 61: SAXS-Streukurven von PM-D85T Filmen, die aus wässriger Suspension bei pH=2 mit und ohne Chlorid-Ionen erhalten wurden, sowie eines PM-WT-Filmes aus Suspension ohne Chlorid-Ionen bei pH 2. In der chloridfreien Umgebung ist PM-D85T nicht kristallin (blaue Kurve). In Gegenwart von Chlorid-Ionen hat PM-D85T ein hexagonales Gitter (grüne Kurve). PM-WT ist ohne Chlorid-Ionen bei pH 2 kristallin (rote Kurve).

Die Chlorid-Ionen, die sich in der Anfangssuspension befinden, unterstützen bei der Bildung des PM-Films die Bildung des zweidimensionalen Gitters von D85T, sie wirken aber nicht auf PM-WT. Folglich braucht man für die Entstehung des geordneten Gitters von PM-D85T zwei Bedingungen: die Gegenwart von Chlorid-Ionen und einen pH-Wert  $\leq 4$  in der Anfangssuspension. Jedoch gibt es noch eine Bedingung der Entstehung der geordneten Struktur von PM-D85T, dabei handelt es sich um die Konzentration von PM in der Anfangssuspension (Abb. 62). Während die SAXS-Messungen für Anfangskonzentrationen von 10% und 4% noch den charakteristischen Verlauf für ein hexagonales PM-Gitter zeigen, ist dies für eine Anfangskonzentration von 2% nicht mehr der Fall. Zudem weist letztere Film auch eine schwarze Farbe auf, dies lässt vermuten, dass sich die PM unter diesen Bedingungen chemisch zersetzt.

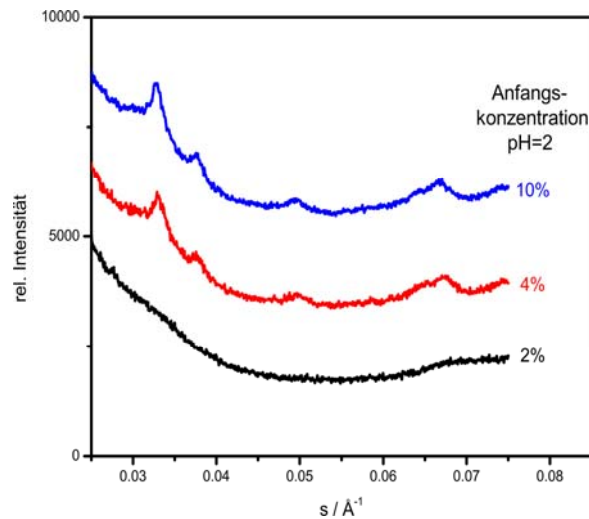


Abb. 62: SAXS-Streukurven von PM-D85T-Filmen, die aus wässriger Suspension bei verschiedenen Anfangskonzentration von PM bei pH=2 erhalten wurden.

Die Änderungen der Gitterstruktur ist begleitet von einer Farbänderungen der PM-Filme von blau bei  $\text{pH} \geq 6$  zur lila bei  $\text{pH} \leq 4$ . (Abb. 63).

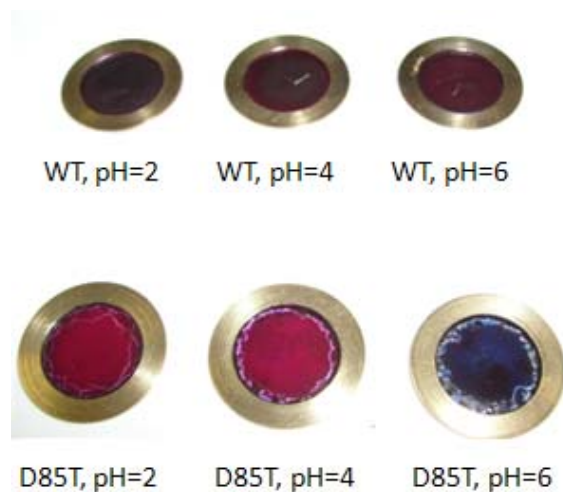


Abb. 63: Fotografische Aufnahmen verschiedener PM-Filme, deren SAXS-Messungen in Abb. 60 gezeigt sind.

Das Absorptionsband von PM-D85T (pH 4) bei  $\lambda = 570 \text{ nm}$  zeigt eine Rotverschiebung zu  $\lambda = 590 \text{ nm}$  bei pH 6 und eine Blauverschiebung zur  $\lambda = 540 \text{ nm}$  bei  $\text{pH} \leq 4$  (Abb. 64), die früher schon beobachtet wurde. [66] Daher ist die blaue Farbe der Probe ein Kennzeichen des Fehlens seines hexagonalen Gitters.

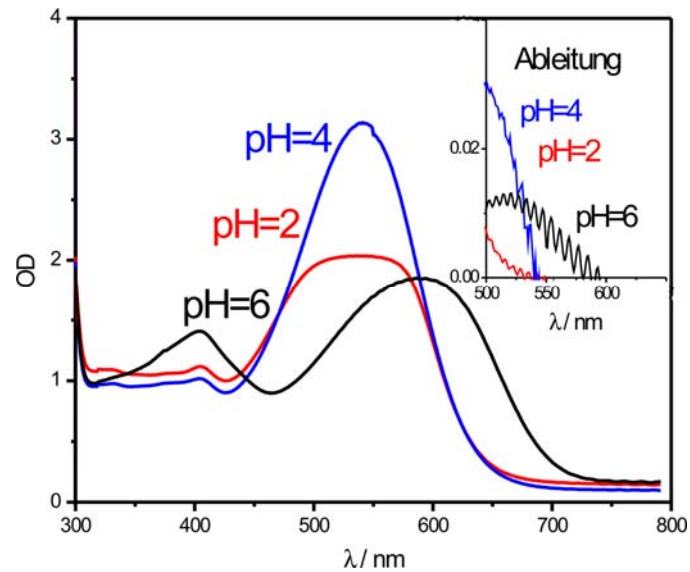


Abb. 64: UV-Vis-Spektren von PM-D85T Filmen, die aus chloridhaltigen wässriger Suspensionen bei verschiedenem pH erhalten wurden. Eingefügt in das Diagramm sind die Ableitungen der Spektren.

Die SAXS-Analysen wurden mittels Elektronenmikroskopie von PM-D85T ergänzt. Während aus SAXS-Analysen statistische Aussagen getroffen werden können, geben Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) und SEM eine Vorstellung von der geometrischen Form und der Anordnung einzelner Membranen von PM-D85T, die sowohl im realen Raum als auch im Fourier-Raum analysiert werden. In Abb. 8 sind TEM-Aufnahmen getrockneter Proben von D85T aus Suspension bei pH 2 dargestellt. Abbildung 8a<sub>1</sub> zeigt ein TEM-Bild von PM-D85T in einer schockgefrorenen, leicht alkalischen, chloridfreien Suspension (pH 8,1). In der Fourier-Analyse sind keine Reflexionen (Abb. 65a<sub>2</sub>) zu erkennen.



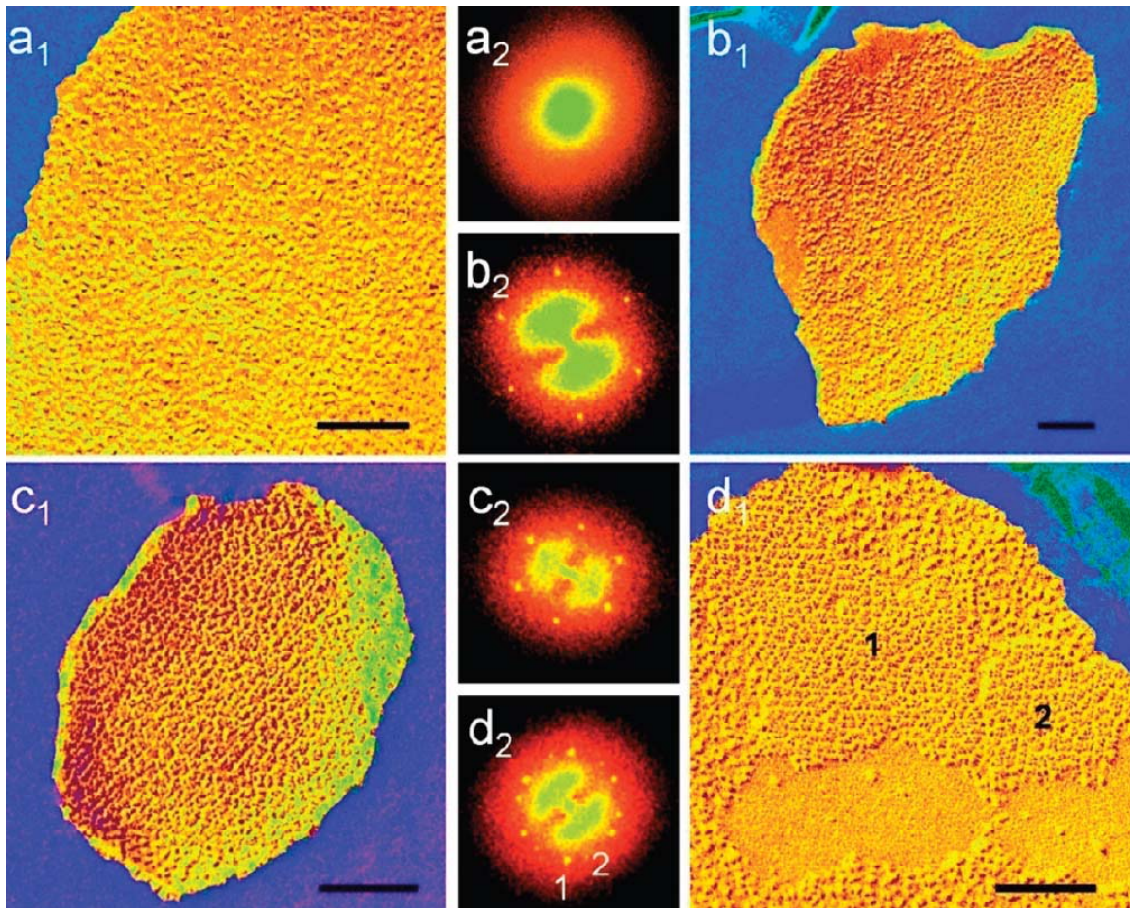


Abb. 65: TEM-Aufnahmen (Indices 1) und zugehörige Fourier-Analysen (Indices 2) von PM-D85T, hergestellt durch Gefrierbruch. (a) PM-D85T bei pH = 8,1 ohne Chlorid. (b bis d) PM-D85T bei pH = 4 in 1 M NaCl. Die in (b) gezeigte PM weist eine kristalline Domäne rechts oben auf, die in (c) gezeigte ist komplett kristallin. Die Fourier-Analysen zeigen jeweils eine Monokristallinität. Die in (d) gezeigte Membran weist zwei große kristalline Bereiche auf, die räumlich zueinander verdreht sind, wie in der Fourier-Analyse erkennbar ist. Die Länge des Maßstabs in den TEM-Aufnahmen beträgt 100 nm. [62]

Werden die TEM-Proben aus Suspensionen von PM-D85T bei pH 4 und einer Chloridkonzentration von 1M gewonnen, weisen die einzelnen PM kristalline Bereich auf, wie in Abb. 65 b bis d und den zugehörigen Fourier-Analysen gezeigt. Dreiverschiedene Typen der Membranen werden beobachtet. In ersten Fall ist nur ein Teil der Membran kristallin (Abb. 8b<sub>1</sub>, der kristalline Bereich liegt rechts oben), die Fläche beträgt etwas mehr als 10.000 nm<sup>2</sup>, die in der nichtkristallinen Membran liegt. Die Fourier-Analyse zeigt die Kristallinität (Abb. 65b<sub>2</sub>). Auch eine kontinuierlich monokristalline Membran wurde beobachtet (Abb. 65c<sub>1</sub>), die Fourieranalyse bestätigt deren Monokristallinität (Abb. 65c<sub>2</sub>). Auch Membrane mit mehr als einem kristallinen Bereiche mit zueinander unterschiedlichen Winkelstellungen wurden beobachtet (Abb. 65d<sub>1</sub>, mit 1 und 2 gekennzeichnet). Die zugehörige Fourieranalyse zeigt deutlich die unterschiedliche räumliche Lage der zwei kristallinen Bereiche (Abb. 65d<sub>2</sub>).

SEM-Aufnahmen sind in Abb. 66 dargestellt. In dieser Abbildung sieht man deutlich die flache Form den einzelnen PM und deren vertikale Anordnung im Film.



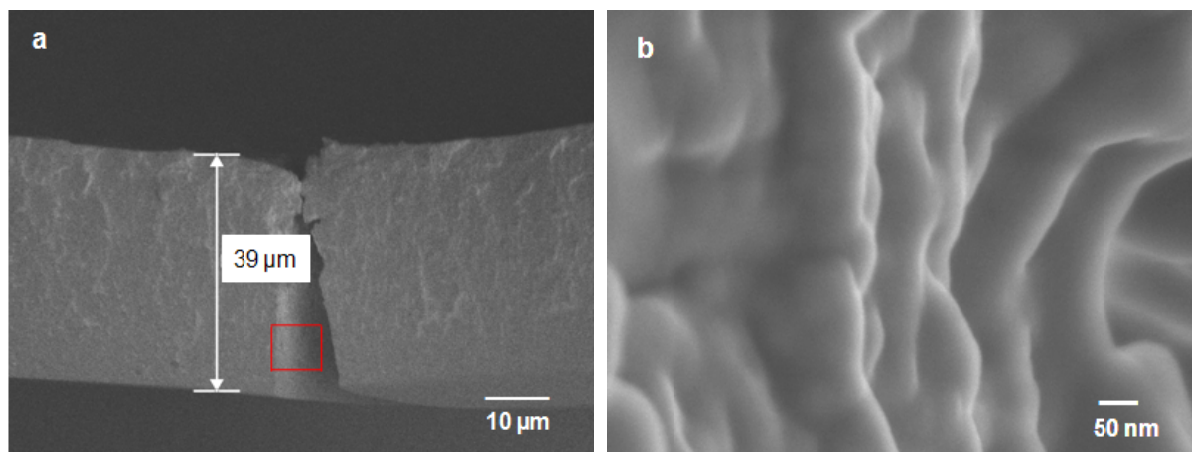


Abb. 66: SEM-Aufnahmen eines PM-D85T-Films, hergestellt aus einer Puffersuspension (10% PM, pH 2, 1 M NaCl). Links: Querschnitt des Films, rechts: Vergrößerung aus dem in linken Bild markierten Bereich.

Der Ersatz der Aminosäure D85 in BR durch Threonin ändert die pKa-Werte nahezu aller für den Protonentransport verantwortlichen Aminosäurereste, [58,61,66,137] dies hat einen nicht zu vernachlässigenden Einfluss auf die strukturelle Integrität von BR. In BR-D85X (X steht für eine neutrale Aminosäure) werden strukturelle Intermediate des BR-Photozyklus, die in PM-WT lichtabhängig ausgebildet werden, durch einfache Änderung des pH-Wertes der Suspension zugänglich.[66,61,138] Beispielsweise akkumulieren BR-D85X Mutanten bei alkalischen pH-Werten im  $M^{II}$ -Zustand, in diesem Zustand ist BR zur zytoplasmatischen Seite hin geöffnet [138]. Dies beeinflusst die Membrantopologie und aufgrund der Keilform der BR-Moleküle auch die Gitterstruktur [139-141]. Ein Strukturmodell von PM-D85S, eine zu PM-D85T homologe PM, wurde mittels Röntgenkristallographie erhalten [142]. Dieses zeigt, dass ein O-Intermediat bei saurem pH-Wert gebildet wurde. Abb. 67a hebt die Unterschiede zwischen PM-D85S und PM-WT hervor. Die umfangreichsten Abweichungen sind auf der extrazellulären Seite des BR zu sehen. Die Helices A, B, D und E neigen nach außen, das resultiert in einer Öffnung im extrazellulären Teil des Kanals von BR-D85S (Abbildung 67a, b), dies wiederum führt zu keilförmigen BR-Molekülen. Es ist sehr wahrscheinlich, dass die erhöhte strukturelle Flexibilität von BR-D85T sich negativ auf seine Kristallisationstendenz auswirkt, weil die Gitteranordnung der PM entscheidend von den richtigen Wechselwirkungen zwischen spezifischen Resten abhängt. [42] Durch spektroskopische und Transportmessungen wurde gezeigt, dass eine Anionenbindungsstelle in BR-D85T bei  $pH < 7$  geschaffen wird, die eine hohe Affinität zu Chlorid-Ionen hat. [66] Gemäß einer Röntgen-Strukturanalyse von BR-D85S [143] wird das Anion fest in die Retinal-Bindungstasche gebunden, wie in Abb. 10f schematisch dargestellt ist. In [143] wurde gezeigt, dass die Bindung des Anions in BR-D85S von Bewegungen der Helices begleitet wird, die zur Schließung des extrazellulären Kanals führen. Dadurch wird eine Wildtyp-ähnliche Struktur erzeugt. Abb. 67c und d zeigen die Strukturunterschiede zwischen Anionen-freiem BR-D85S und Anionen-gebundenem BR-D85S. Die Anionenbindung bei sauren pH-Werten (Abb. 10f) führt zu Wildtyp-ähnlichen BR-D85S-Molekülen, die eine verminderte Flexibilität zeigen. Die hier vorgestellten Experimente zeigen, dass sich eine hexagonale Gitterstruktur von BR-D85T durch strukturelle Stabilisierung mit Hilfe von Chlorid-Ionen ausbildet und stabilisiert (Abb. 67e, g).

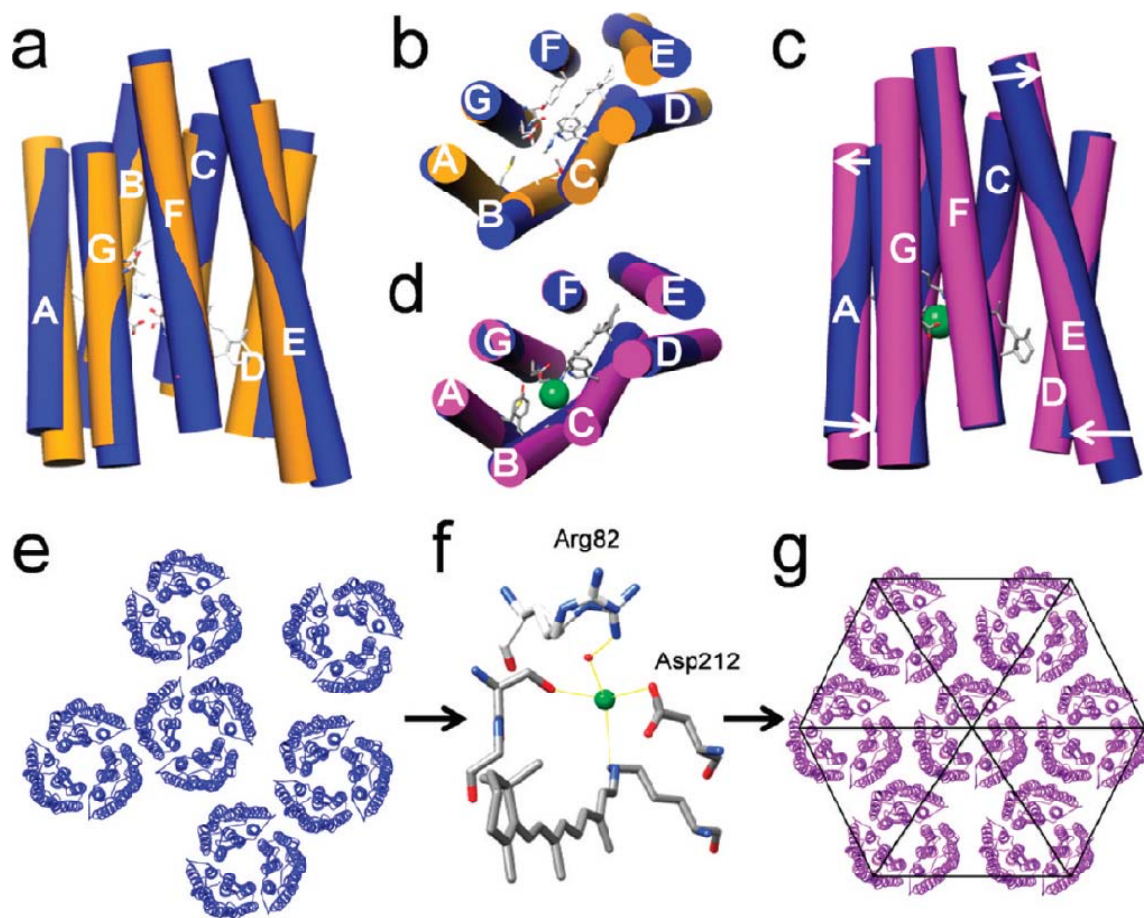


Abb. 67: Modell für die Chlorid-vermittelte Kristallisation von PM-D85T. (a) Strukturelle Unterschiede zwischen PM-WT (gelb) und anionenfreier PM-D85S (blau). (b) Sicht von oben auf (a), extrazelluläre Seite. (c) Strukturelle Veränderungen in BR-D85S (blau) durch Anionenbindung (violett). Bromid ist als grüne Kugel dargestellt. Die Bewegungen der Helices sind durch weiße Pfeile gekennzeichnet. (d) Sicht von oben auf (c), extrazelluläre Seite. (e) Nichtkristalline Anordnung von BR-Trimeren in PM-D85T vor der Anionenbindung. (f) Struktur der Anion-Bindungsstelle von BR-D85S, erhalten aus Röntgenstrukturanalyse. (g) Kristallisation von PM-D85T bei einer Chloridbindung. [62]

Mittels Strukturanalyse über SAXS und TEM wurde nachgewiesen, dass die Umwandlung von BR in eine Chlorid-Pumpe durch eine einzige Punktmutation seine Tendenz zur Kristallisation beeinflusst. PM-D85T bildet kohärente kristalline Domänen, sobald die Tertiärstruktur des BR-D85T durch eine Bindung von Chlorid-Ionen in der Retinalbindungstasche stabilisiert wird. Im Gegensatz zu Halorhodopsin, welches orthogonale kristalline Membranen mit  $p4_2$  Symmetrie in der Zellmembran eines überproduzierenden Stamms von *H. salinarum* ausbildet, [144-146] formt die Chlorid-Pumpe BR-D85T hexagonale Kristalle wie der PM-Wildtyp mit  $p3$ -Symmetrie.

### 5.5. Der $P_{360}$ -Zustand

In diesem Kapitel werden durch Zweiphotonenabsorption hochintensiven Laserlichts von PM hervorgerufene Strukturänderungen beschrieben.

Als eine Quelle hoher Strahlintensität wurde ein Nd:YAG-Festkörperlaser verwendet. Die Photoprodukte wurden mittels UV-Vis-Spektroskopie charakterisiert und die Resultate mit den Ergebnissen der anderen Methoden verglichen.

Zuerst werden die Ergebnisse der Bestrahlung von PM-Suspensionen und der daraus erhaltenen PM-Filme vorgestellt (Abb.68). Im Laufe der Bestrahlung mit intensiven Laserpulsen (80 mJ Output) sinkt das Absorptionsmaximum bei 570 nm, gleichzeitig entsteht ein rotverschobenes Photoprodukt ( $F_{620}$ -Zustand) und Photoprodukte, die um 340 und 360 nm absorbieren.

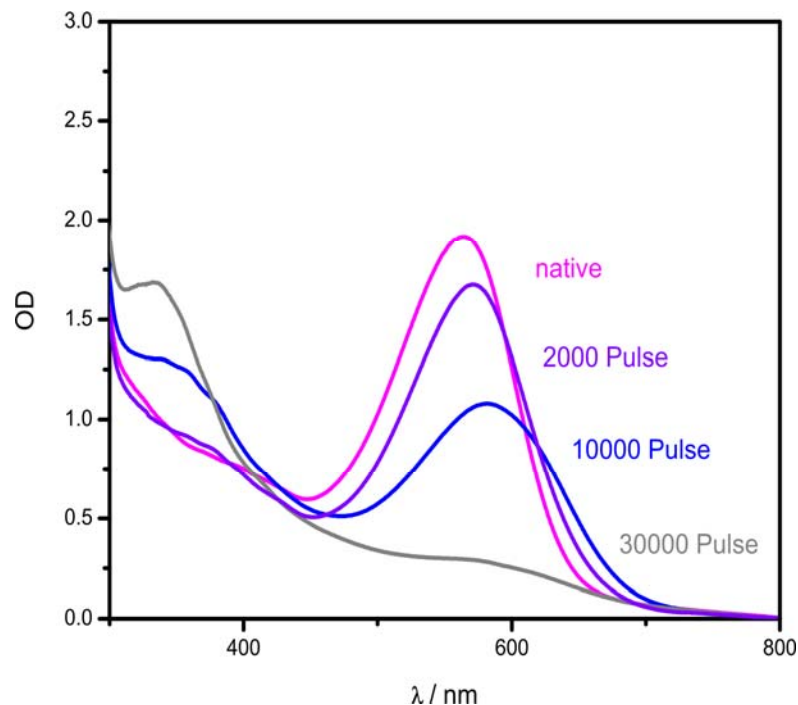


Abb. 68: UV/Vis-Spektren getrockneter Filme aus den photogelebten PM-Suspensionen in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis.

Dabei entsteht schon nach 2000 Pulsen das  $BR_{360}$ -Photoprodukt (Absorptionsmaximum bei 360 nm) parallel zum  $F_{620}$ -Zustand (Abb. 69). Bei weiterer Bestrahlung verwandelt sich das Photoprodukt  $F_{620}$  in das Photoprodukt  $BR_{340}$  (10000 Pulse), und schließlich (nach 30000 Pulsen) werden zwei Photoprodukte  $P_{360}$  und  $P_{340}$  (über das Intermediat  $F_{620}$ ) erhalten.

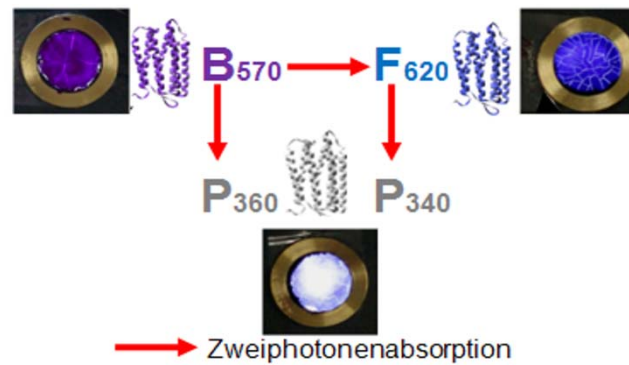


Abb.69: Schematische Darstellung der Prozesse bei Zweiphotonenabsorption von BR nach Bildung des  $B_{570}$ -Zustandes.

Außer den spektralen Änderungen von BR im UV-Vis-Bereich verliert die PM bei Zweiphotonenabsorption ihre Kristallinität. SAXS erlaubt, die Änderungen der Kristallinität von PM bei Bestrahlung verfolgen. Abb. 70 zeigt den progressiven Verlust der Kristallinität in Folge der Belaserung. Die durch das hexagonale Gitter hervorgerufenen Streusignale nehmen schon nach 2000 Pulsen ab und sind mit Ausnahme eines breiten Signals bei  $0,032 \text{ \AA}^{-1}$  (entspricht der Lage des (1;1)-Peaks) und des (1;0)-Peaks bei  $0,0196 \text{ \AA}^{-1}$  nach 10000 Pulsen verschwunden. Das breite Signal deutet auf eine zunehmende Unordnung der BR-Trimere in der PM hin. Eine Substanz, die eine solche Verbreiterung der Peaks (1;0) und (1;1) zeigt, wird als „2D liquid“ bezeichnet [114]. Der  $F_{620}$ -Zustand weist anscheinend ein schwach geordnetes hexagonales Gitter auf.

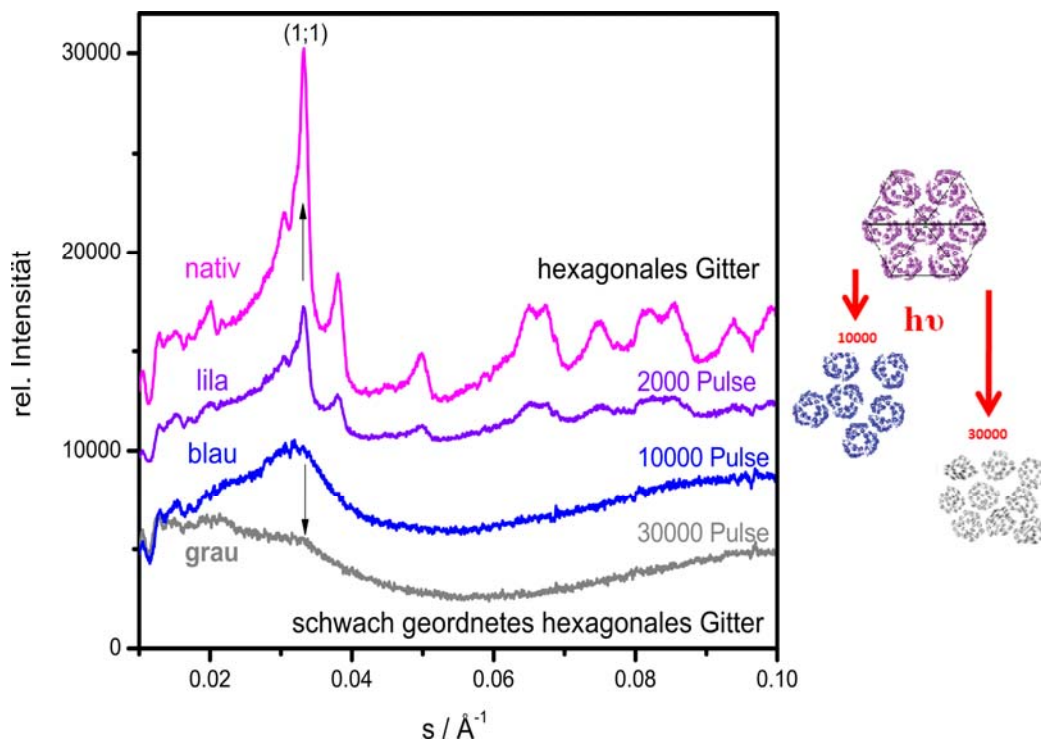


Abb. 70: Änderungen des hexagonalen Gitters bei Bestrahlung. (a) SAXS-Streukurven des hexagonalen Gitters von getrockneten Filmen aus der photogelebten PM-Suspensionen. Die Kristallinität der PM geht mit zunehmender Bestrahlungsdosis verloren. (b) Schematische Darstellung des Verlustes der Kristallinität von PM bei Bestrahlung.

Bei weiterer Bestrahlung (30000 Pulse) verliert PM ihre Kristallinität. Die Streukurve hat nur noch zwei schwache breite Peaks ((1;0) und (1;1)). Das zeigt den Übergang zum ungeordneten Zustand, und die zwei schwachen Peaks resultieren aus einem übrig gebliebenen Rest des  $F_{620}$ -Zustands von BR in der bestrahlten Suspension (siehe Abb. 68, graue Kurve). Die Zustände  $P_{340}$  und  $P_{360}$  hingegen besitzen ein ungeordnetes Gitter.

Neben dem Verlust der Kristallinität findet bei einer Photoreaktion auch eine Verminderung der Dicke von PM (Abb. 71) statt. Die Dicke von PM in einer nativen Probe ist 46,5 Å. Nach Zweiphotonenabsorption reduziert sich die Periodizität der lamellaren Struktur im Film auf 45,5 Å, das heißt, die Dicke von PM nimmt ab.

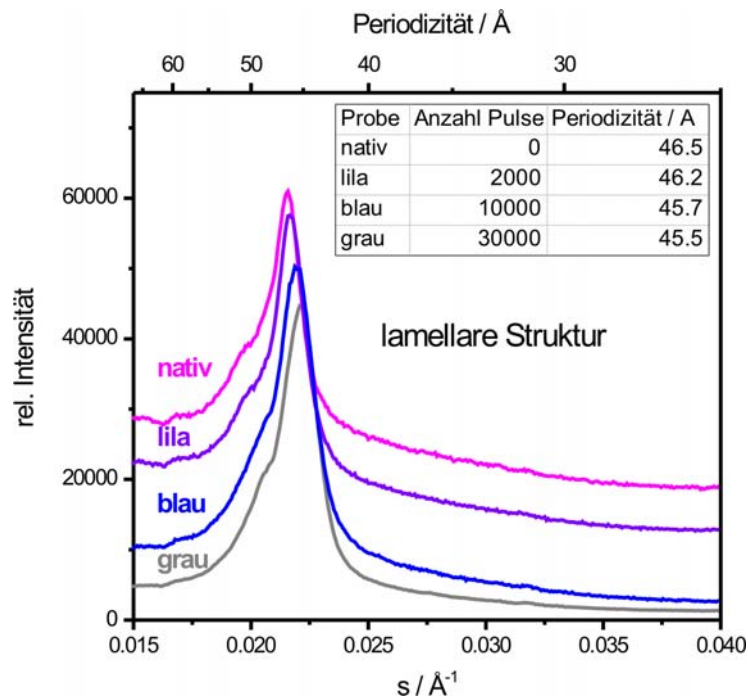


Abb. 71: SAXS-Streukurven der lamellaren Struktur von getrockneten Filmen aus einer photogeblichen PM-Suspension. Die Lage des Maximums des Peaks zeigt die Dicke von PM. Bei Bestrahlung findet eine Verringerung der Dicke von PM statt.

Trotz der Änderung der Gitterstruktur und der Verminderung der Dicke von PM bleibt die Intensität des Peaks der lamellaren Struktur unveränderlich. Das zeigt, dass der Zweiphotonenabsorptionsprozess die PM nicht zerstört.

Die Strukturänderung durch Zweiphotonenabsorption findet schon in der Suspension statt. Um dies zu kontrollieren, wurden eine Probe der bestrahlten PM-Suspension (10000 Pulse) und eine unbestrahlte Probe jeweils in einer Glaskapillare mittels SAXS untersucht. Dazu wurden beide PM-Suspensionen auf etwa 7% konzentriert. Abb. 72 zeigt die beiden erhaltenen Streukurven.



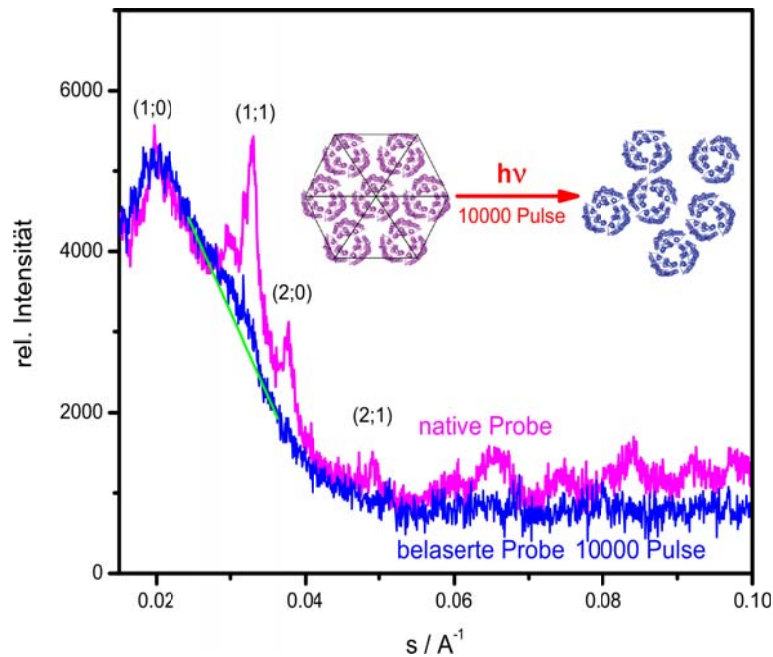


Abb.72: SAXS-Streukurven einer unbelaserten und einer nach 10000 Pulsen photogeblichen PM-Suspension.

In der Streukurve der belaserten Suspension (blau) ist nur noch ein sehr breiter Peak (1;1) des hexagonalen Gitters zu sehen, während das Spektrum der unbelaserten Suspension dem einer kristallinen PM entspricht. Der Grad der Strukturänderungen ähnelt dem im Fall der getrockneten Filme gemessenen.

Wie im Kapitel 4.3.1. am Beispiel BR-D85T schon gezeigt wurde, weist eine Blaufärbung von PM auf Störungen des hexagonalen Gitters hin. Dies zeigt sich auch hier. Die Proben haben nach unterschiedlicher Bestrahlungsintensität unterschiedliche Farben: purpur – native Probe, lila nach 2000 Pulsen, blau nach 10000 Pulsen und grau (grau-blau) nach 30000 Pulsen (Abb. 73). Man sieht einen Übergang von der spezifischen Farbe der nativen PM-Probe (Kontrollexperiment) zu der geblichenen grau-blauen Probe, die den Rest von blauer PM im  $F_{620}$ -Zustand hat.

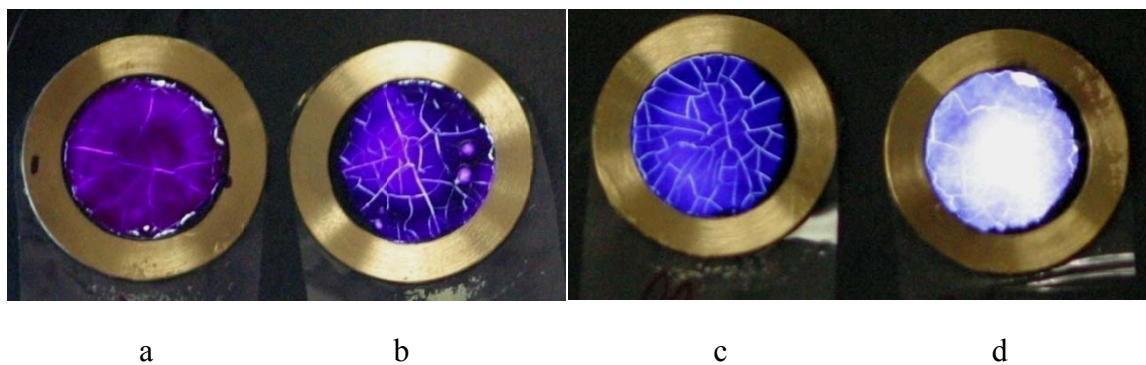


Abb. 73: Fotografische Aufnahmen von getrockneten Filmen aus photogeblichen PM-Suspensionen und eines unbestrahlten Kontrollfilms. (a) Kontrolle. (b) nach 2000 Pulsen. (c) nach 10000 Pulsen. (d) nach 30000 Pulsen.

Die bestrahlte (nach 10000 Pulsen) PM-Suspension hat in flüssigem und getrocknetem Zustand die gleiche blaue Farbe (für das Auge) und zeigt die gleichen Änderungen der Streukurven, deswegen kann man behaupten, dass der Trocknungsprozess keine Wirkung auf die Struktur von PM einer bestrahlten Suspension hat.

Die nachfolgende SEM-Untersuchung hat gezeigt, dass getrocknete Filme aus bestrahlter PM-Suspension (Abb. 73 d) eine flache Form haben (Abb. 74).

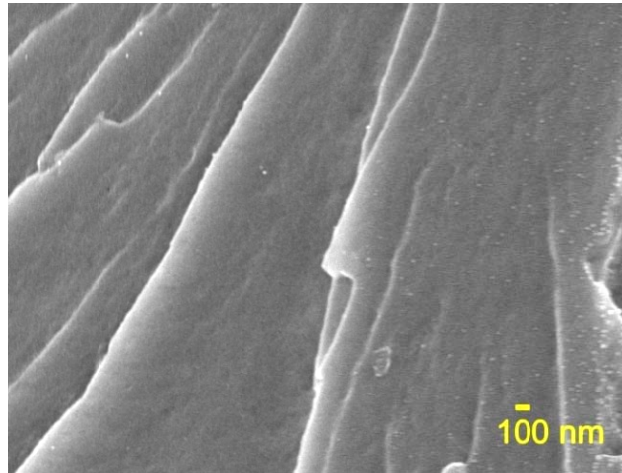


Abb. 74: SEM-Aufnahme der Bruchkante eines getrockneten PM-Films, der aus mit 30000 Pulsen bestrahlter PM-Suspension hergestellt wurde.

SAXS-Spektren von PM-Filmen aus bestrahlten und unbestrahlten Suspensionen liefern einen weiteren Hinweis darauf. In Abb. 75 sind die Abhängigkeiten der Streuintensitäten des lamellaren Peaks zweier Filme aus bestrahlter und unbestrahlter PM-Suspension vom Einfallswinkel des Röntgenstrahls gezeigt. Diese Abhängigkeiten unterscheiden sich für die beiden Filme nahezu nicht. Zusammen mit den Ergebnissen aus SEM-Untersuchungen (Abb. 74) kann daraus geschlossen werden, dass der Verlust der Kristallinität von PM kein Ergebnis der Krümmung der Membranen ist.

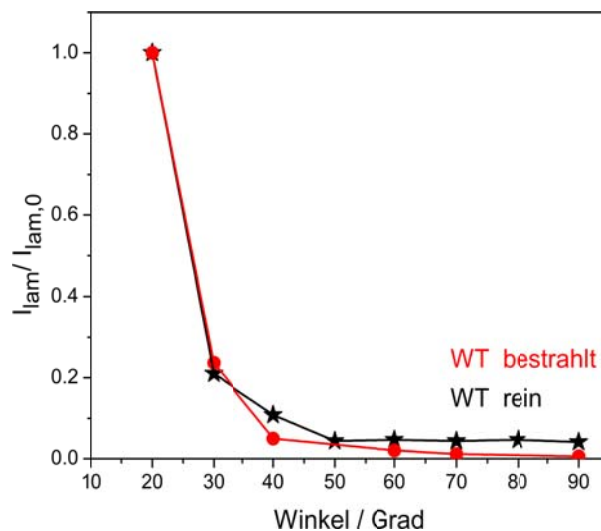


Abb. 75: Abhängigkeit der normierten Intensität des Peaks der lamellaren Struktur von Einfallswinkel für getrocknete Filme aus photogeblicher PM-Suspension (rote Punkte, 30000 Pulse) und unbestrahlter Suspension (schwarze Sternchen, Kontrolle).



Der Zweiphotonenabsorptionsprozess von PM-Gelatine-Filme verläuft mit anderen Resultaten (Abb. 76). Im Laufe der Bestrahlung mit intensiven Laserpulsen (80 mJ Output) sinkt das Absorptionsmaximum bei 570 nm, gleichzeitig entsteht ein blauverschobenes Photoprodukt und die Photoprodukten, die um 340 und 360 nm absorbieren. Die blaue Verschiebung des Absorptionsbands bei 570 nm ist wahrscheinlich das Ergebnis hoher Temperaturen bei der Bestrahlung. Neebe hat gezeigt, dass BR eine hypsochrome Verschiebung bei Erwärmung hat. [147] Das Absorptionsmaximum wandert bei Erwärmung von 562 nm zu 515 nm. Hier entsteht das blauverschobene Maximum bei intensiven Laserpulsen in der Position von ca. 530 nm, das stimmt gut mit der Laseremission 532 nm überein. Anscheinend verlaufen hier zwei Prozesse ab: eine hypsochrome Verschiebung bei thermischer Anregung und die Zweiphotonenabsorption. Um den zeitlichen Ablauf dieser Prozesse festzustellen, müssen zusätzliche Experimente durchgeführt werden.

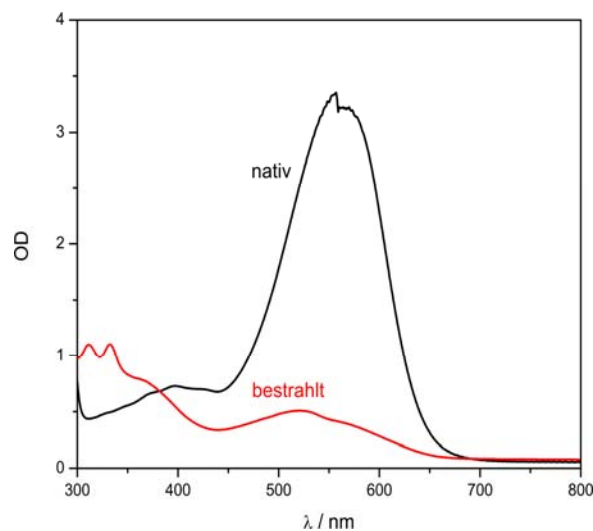


Abb. 76: UV/Vis-Spektren eines photogeleichten getrockneten Films (rot) und eines unbestrahlten getrockneten Films (schwarz).

Wie schon erwähnt wurde, führen hohe Temperaturen zu thermochromen Änderungen von BR, ohne dass die PM zerstört werden. Das ist in Abb. 77 zu erkennen. Der Peak der lamellaren Struktur von PM ändert seine Form und Intensität nach der Belaserung des PM-Films nicht, die PM bleiben als Ganzes unversehrt.

Die Streuintensität des hexagonalen Gitters sinkt nach der Bestrahlung (Abb. 77, Streukurven b). In dem Experiment photolysieren 85% des  $B_{570}$ -Zustands der nativen Probe, dabei ändert sich das hexagonale Gitter vergleichbar mit dem Experiment an PM-Suspension nach 2000 Laserpulsen wie eine Vergleich der SAXS-Daten nahelegt (Abb. 77 Kurven b und Abb. 70). Die Streukurve hier zeugt nur die Peaks der hexagonalen Struktur mit kleiner Intensität und keinen breiten Peak (1;1) wie im Fall der PM-Suspension nach Zweiphotonenabsorption. Das bedeutet, dass im PM-Film mit Gelatine kein  $F_{620}$ -Zustand mit schwach ungeordnetem hexagonalem Gitter entsteht. Anscheinend werden im Laufe der Bestrahlung mit intensiven Laserpulsens bei der Zweiphotonenabsorption die Photoprodukte, die um 340 und 360 nm absorbieren, gleichzeitig gebildet. Alternativ könnte auch zuerst das blauverschobene Photoprodukt mit dem Absorptionsmaximum bei 530 nm gebildet werden und anschließend eine Photoreaktion aufgrund der Übereinstimmung des Absorptionsmaximums mit der Wel-

lenlänge der eingestrahnten Laserpulse (532 nm) ablaufen (Abb. 76). Um den Reaktionsablauf aufzuklären, sind weitere Experimente notwendig

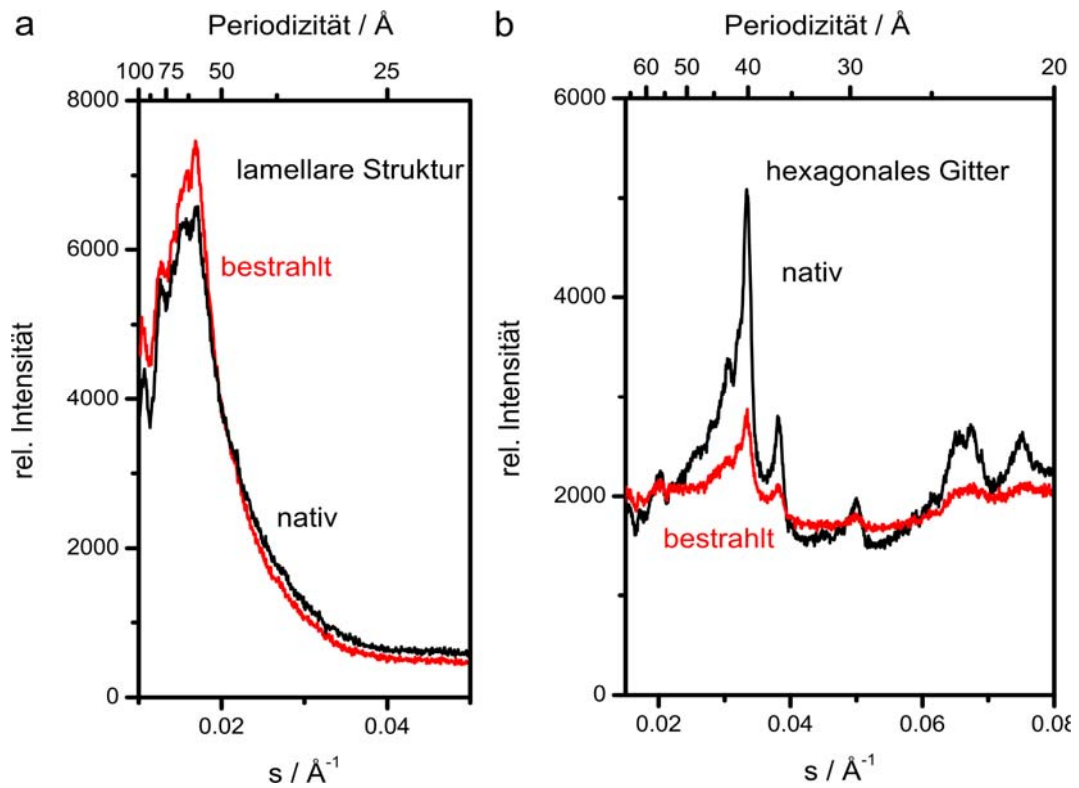


Abb. 77: SAXS-Streukurven (a) der lamellaren Struktur und (b) des hexagonalen Gitters eines getrockneten PM-Gelatine-Films vor (nativ, schwarz) und nach der Laserbestrahlung (rot).

## 6. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Vorgang der Selbstorganisation von PM bei Trocknung im Film beobachtet. Es wurde festgestellt, dass ab einer Periodizität von ca. 59 Å eine stabile lamellare Struktur mit senkrechten zur Oberfläche orientierten PM entsteht, das entspricht vier Schichten Wassermolekülen zwischen den Membranen. Zudem tritt eine Streuisotropie bei Drehung der Probe im SAXS-Experiment um eine Achse auf, die senkrecht zur Filmoberfläche steht. Daraus lässt sich schließen, dass die PM im Film eine Nahordnung und keine Fernordnung besitzen.

Man kann vermuten, dass vier Wasserschichten 2+2 Schichten sind. Dabei handelt es sich um die erste und die zweite Hydrathülle von PM. In den vorgestellten *in-situ*-Experimenten zeigt sich eine schwache Wechselwirkung von PM mit der zweiten Hydrathülle. Das ist in den Trocknungs- und Gefriertrocknungsexperimenten zu erkennen.

Es wurde gezeigt, dass in einer wässrigen Suspension PM eine chaotische Verteilung außerhalb der unmittelbaren Wasser-Luft-Grenzfläche aufweisen. In dieser Grenzschicht sind die Membranen wegen ihrer hydrophilen und hydrophoben Eigenschaften senkrecht zur Wasseroberfläche orientiert. Die PM stehen mit ihren hydrophoben Kanten senkrecht zur Wasser-Luft-Grenzfläche. Bei Trocknung konzentriert sich die Suspension, die oberste Schicht nähert sich den unteren Schichten an und induziert die Orientierung der nächsten orientierten Schicht. Ein Sedimentationsprozess oder ein Substrat haben keine Wirkung auf die Orientierung der PM bei der Filmherstellung aus einer wässrigen Suspension, PM steht in den Filmen senkrecht zur Filmoberfläche.

Eine gleichmäßige Verteilung von PM in PM-Glycerin-Filmen wird möglicherweise durch die gegenseitige Abstoßung der negativ geladenen Membranen erreicht. Somit sind zwei Effekte zu beobachten: die Bildung der bevorzugten Orientierung der Membranen bezüglich der Filmoberfläche sowie die Bildung einer stabilen Lamellenstruktur, also die gleichmäßige Verteilung von PM in Filmen mit Glycerin. Die Stabilität der lamellaren Struktur mit einer Periodizität bis zu ca. 200 nm ist wahrscheinlich eine Folge der hohen Viskosität von Glycerin und daher der geringeren Beweglichkeit von PM im Film. Nach derzeitigem Kenntnisstand ist erstaunlich, dass sich PM in Filmen mit Glycerin nicht nur zu fast monomodaler Periodizität verteilen, sondern dass sie auch eine bevorzugte Orientierung haben. Wie im Fall reiner PM-Filme gezeigt wurde haben ein Substrat oder eine Sedimentation keine Wirkung auf die Selbstorganisation von PM in Filmen mit Glycerin.

Es wurde gezeigt, dass bei Trocknung wässriger Suspensionen von PM in Gegenwart von Gelatine bei einer Temperatur der Ausgangssuspension von 35°C und bei einem Verhältnis PM/Gelatine von 1/1 die Membranen im getrockneten Film eine periodische, lamellare Struktur bilden und eine bevorzugte Orientierung aufweisen. Eine Erhöhung der Temperatur der Ausgangssuspension führt dazu, dass die getrockneten Filme keine periodische, lamellare Struktur mehr ausbilden, allerdings weist die PM in diesen Filmen eine Vorzugsorientierung in eine Raumrichtung auf.

In Gegenwart von PVA beträgt die Periodizität der PM-Lamellen  $47 \text{ \AA}$  und ist damit genauso groß wie in einem Film aus reinem PM, das bedeutet, dass sich PVA außerhalb der PM-Stapel im Film befinden muss, dabei weisen die Membranen eine bevorzugte Orientierung auf.

In dieser Arbeit wurden die unterschiedlichen Verteilungen von PM in Filmen mit direktem Kontakt zwischen den Membranen (PM-PVA-Filme) oder ohne Kontakt (PM-Glycerin- und PM-Gelatine-Filme) gezeigt. Dies ist für das weitere Verständnis der Eigenschaften von PM-Filmen von Bedeutung. PM bilden bei der Trocknung mit Glycerin, Gelatine oder PVA verschiedene lamellare Strukturen, aber alle Filme zeigen die gleiche bevorzugte Orientierung. Es wurde die Selbstorganisation von PM bei Trocknung in Gegenwart dieser Stoffe beobachtet, ohne dabei die Wechselwirkung von PM mit diesen Substanzen zu untersuchen, die oft als Matrices für PM-Filme für verschiedene technische Anwendungen verwendet werden.

Die Wechselwirkung von PM mit der Wasseroberfläche und die Wechselwirkung zwischen den PM, die zu der Orientierung von PM bei der Trocknung führt, führt zur Selbstorganisation der PM. Diese wiederum führt in einer ganzen Reihe von Filmvarianten zu einer monomodalen Periodizität von PM. Diese zur Selbstorganisation führenden Wechselwirkungen sind so stark, dass sie von einer Gegenwart solcher unterschiedlichen Matrices wie Glycerin, Gelatine oder PVA in der Suspension nicht beeinflusst werden.

Auch wurde gezeigt, wie eine einzelne Punktmutation im Inneren von BR die 2D-Kristallstruktur von PM in Abhängigkeit von physikalisch-chemischen Bedingungen beeinflusst. BR, bei der der primäre Protonenakzeptor Asparaginsäure an der Stelle 85 durch Threonin ersetzt ist (BR-D85T), wird zu einer Chloridpumpe. Durch Röntgenkleinwinkelstreuung wurde gezeigt, dass sich nicht kristalline PM aus BR-D85T in einen hoch geordneten hexagonalen 2-D kristallinen Zustand umwandelt, sobald die physikalisch-chemischen Bedingungen die Chloridbindung von BR-D85T begünstigen, d. h., wenn der pH-Wert unter pH 6 und die Chloridkonzentration über 2M betragen. Das hier vorgestellte Modell erklärt die Kristallisationstendenz von BR-D85T mit Konformationsänderungen auf der Ebene einzelner BR-D85T Moleküle.

Bei der Zweiphotonenabsorption von BR entstehen Photoprodukte außerhalb des klassischen Photozyklus, dabei finden Veränderungen des hexagonalen Gitters von PM statt, aber die PM als Ganzes bleibt erhalten. Deswegen kann man diese photophysikalisch und photochemisch induzierten Änderungen z. B. für Datenspeicherung verwenden.

Die vorliegende Arbeit hat nicht nur theoretische, sondern auch praktische Bedeutung. Die hier vorgestellten Untersuchungen ermöglichen die Bewertung der Orientierung von PM in Filmen und die Kontrolle der Struktur der Membranen in verschiedenen Stadien der Filmherstellung.

## 7. Literatur

1. Oesterhelt, D., Stoeckenius, W. Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*. *Nat. New Biol.* **1971**, 233, 149-152.
2. Haupts, U., Tittor, J., Oesterhelt, D. Closing in on Bacteriorhodopsin: Progress in Understanding the Molecule. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1999**, 28, 367-399.
3. Lanyi, J. K. Bacteriorhodopsin. *Annu. Rev. Physiol.* **2004**, 66, 665-688.
4. Kolbe, M., Hüseyin, B., Essen, L.-O., Oesterhelt, D. Structure of the light-driven chloride pump halorhodopsin at 1.8 Å resolution. *Science* **2000**, 288, 1390-1396.
5. Luecke, H., Schobert, B., Lanyi, J. K., Spudich, E. N., Spudich, J. L. Crystal structure of sensory rhodopsin II at 2.4 angstroms: insights into color tuning and transducer interaction. *Science* **2001**, 293, 1499-1503.
6. Royant, A., Nollert, P., Edman, K., Neutze, R., Landau, E. M., Pebay-Peyroula, E., Navarro, J. X-ray structure of sensory rhodopsin II at 2.1 Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2001**, 98, 10131-10136.
7. Gordeliy, V. I., Labahn, J., Moukhametzianov, R., Efremov, R., Granzin, J., Schlesinger, R., Büldt, G., Savopol, T., Scheidig, A. J., Klare, J. P., Engelhard, M. Molecular basis of transmembrane signalling by sensoryrhodopsin II-transducer complex. *Nature* **2002**, 419, 484-487.
8. Vogley, L., Sineshekov, O. A., Vishwa, D. T., Sasaki, J., Spudich, J., Luecke, H. Anabaena sensory rhodopsin: a photochromic color sensor at 2.0 Å. *Science* **2004**, 306, 1390-1393.
9. Balashov, S. P., Imasheva, E. S., Boichenko, V. A., Anton, J., Wang, J. M., Lanyi, J. K. Xanthorhodopsin: a proton pump with a light harvesting carotenoid antenna. *Science* **2005**, 309, 2061-2064.
10. Spudich, J. L. The multitasking microbial sensory rhodopsins. *Trends Microbiol.* **2006**, 14, 480-487.
11. Birge, R. R., Gillespie, N. B., Izaguirre, E. W., Kusnetzow, A., Lawrence, A. F., Singh, D., Wang Song, Q., Schmidt, E., Stuart, J. A.; Seetharaman, S., Wise, K. J. Biomolecular Electronics: Protein-Based Associative Processors and Volumetric Memories. *J. Phys. Chem. B* **1999**, 103, 10746-10766.
12. Hampp N. A., Oesterhelt, D. Bacteriorhodopsin and its Potential in Technical Applications. In: "Nanobiotechnology: Concepts, Applications and Perspectives"; Mirkin, C., Niemeyer, C. (eds.), Wiley-VCH, Weinheim, Deutschland **2004**, 146-167.
13. Hampp, N. Bacteriorhodopsin as a Photochromic Retinal Protein for Optical Memories. *Chem. Rev.* **2000**, 100, 1755-1776.

14. Hampp, N., Silber, A. Functional Dyes from Nature: Potentials for Technical Applications. *Pure Appl. Chem.* **1996**, 68, 1361-1366.
15. Al-Arife, K. M., Knopf, G. K., Bassi, A. S. Photoelectric Monolayers Based on Self-Assembled and Oriented Purple Membrane Patches. *J. Microelectromech. Syst.* **2011**, 20, 800-810.
16. Roy, S., Prasad, M., Topolancik, J., Vollmer, F. All-optical switching with bacteriorhodopsin protein coated microcavities and its application to low power computing circuits. *J. Appl. Phys.* **2010**, 107, 053115-053124.
17. Koyama K., Yamaguchi, N., Miyasaka, T. Antibody-Mediated Bacteriorhodopsin Orientation for Molecular Device Architectures. *Science* **1994**, 265, 762.
18. Schranz M., Noll, F., Hampp, N. Oriented Purple Membrane Monolayers Covalently Attached to Gold by Multiple Thiole Linkages Analyzed by Single Molecule Force Spectroscopy. *Langmuir* **2007**, 23, 11134.
19. Saab, M.-B., Estephan, E., Cloitre, T., Legros, R., Cuisinier, F. J. G., Zimanyi, L., Gergely, C. Assembly of Purple Membranes on Polyelectrolyte Films. *Langmuir* **2009**, 25, 5159-5167.
20. Collins, A. M., Kaus, N. H. M., Speranza, F., Briscoe, W. H., Rhinow, D., Hampp, N., Mann, S. Assembly of poly(methacrylate)/purple membrane lamellar nanocomposite films by intercalation and *in situ* polymerization. *J. Mater. Chem.* **2010**, 20, 9037-9041.
21. Chu, J., Li, X.; Tang, J. Studies on poly(ethylenimine)/purple membrane multilayer films fabricated by layer-by-layer self-assembly. *Coll. Surf. A* **2005**, 257-258, 41-45.
22. He, J. A., Samuelson, L., Li, L., Kumar, J., Tripathy, S. K. J. Bacteriorhodopsin Thin-Film Assemblies-Immobilization, Properties and Applications. *Adv. Mater.* **1999**, 11, 435-446.
23. Weetall, H. H., Samuelson, L. A. Optical and electrical properties of bacteriorhodopsin Langmuir-Blodgett films. *Thin Solid Films.* **1998**, 312, 306-312.
24. Kononenko, A. A., Lukashev, E. P., Chamorovskii, S. K., Maksimych, A. V., Timashev, S. F., Chekulaeva, L. N., Rubin, A. B., Pashchenko, V. Z. Oriented purple-membrane films as a probe for studies of the mechanism of bacteriorhodopsin functioning. II. Photoelectric processes. *Biochim. Biophys. Acta.* **1987**, 892, 56-67.
25. Crittenden, S., Howell, S., Reifenberger, R., Hillebrecht, J., Birge, R. R. Humidity-dependent open-circuit photovoltage from a bacteriorhodopsin/indium tin oxide bioelectronic heterostructure. *Nanotechnology* **2003**, 14, 562-571.
26. Bromley, K. M., Patil, A. J., Seddon, A. M., Booth, P., Mann, S. Bio-Functional Mesolamellar Nanocomposites Based on Inorganic/Polymer Intercalation in Purple Membrane (Bacteriorhodopsin) Films. *Adv. Mater.* **2007**, 19, 2433-2438.



27. Collins, A. M., Rhinow, D., Hampp, N., Mann, S. Structure and Properties of Silicified Purple Membrane Thin Films. *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 2767-2771.
28. Bulpett, J. M., Collins, A. M., Kaus, N. H. M., Cresswell, P. T., Bikondoa, O., Walsh, D., Mann, S., Davis, S. A., Briscoe, W. H. Interactions of nanoparticles with purple membrane films. *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 15635.
29. Uruga, T., Hamanaka, T., Wakabayashi, R., Amemiya, Y. X-Ray Diffraction and Flash Photolysis Studies of M Intermediate of Lattice-Contracted Purple Membrane. *J. Biochem.* **1990**, *108*, 938-946.
30. Frankel, R. D., Forsyth, J. M. Time-Resolved X-Ray Diffraction Study of Photostimulated Purple Membrane. *Biophys. J.* **1985**, *47*, 387-393.
31. Sass, H. J., Schachowa, I. W, Rapp, G., Koch, M. H. J., Oesterhelt D., Dencher, N.A., Büldt, G. The tertiary structural changes in bacteriorhodopsin occur between M states: X-ray diffraction and Fourier transform infrared spectroscopy. *EMBO Journal* **1997**, *16*, 1484-1491.
32. Kamikubo, H, Kataoka, M., Varo, G., Oka, T., Tokunaga, F., Needleman, R, Lanyi, J. K. Structure of the N intermediate of bacteriorhodopsin revealed by x-ray diffraction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 1386-1390.
33. Matsui, Y., Sakai, K., Murakami, M., Shiro, Y., Adachi, S., Okumura, H., Kouyama, T. Specific Damage Induced by X-ray Radiation and Structural Changes in the Primary Photoreaction of Bacteriorhodopsin. *J. Mol. Biol.* **2002**, *324*, 469-481.
34. Nakasako, M., Kataoka, M., Tokunaga, F. Arginine remarkably prolongs the lifetime of the M-intermediate in the bacteriorhodopsin photocycle at room temperature. *FEBS* **1989**, *254*, 211-214.
35. Nakasako, M., Kataoka, M., Amemiya, Y., Tokunaga, F. Crystallographic characterization by X-ray diffraction of the M-intermediate from the photo-cycle of bacteriorhodopsin at room Temperature. *FEBS* **1991**, *292*, 73-75.
36. Korenstein, R., Michel, H., Hess, B. The Photocycle of Bacteriorhodopsin in the Two-Dimensional Orthorombic Crystal Form of Purple Membrane. *Biophys. J.* **1985**, *47*, 295-302.
37. Fischer, T., Hampp, N. Two-Photon-Absorption of Bacteriorhodopsin: Formation of a red-shifted thermally stable photoproduct F<sub>620</sub>. *Biophys. J.* **2005**, *89*, 1175-1182.
38. Czege, J., Rheinisch, L. Photodestruction of bacteriorhodopsin. *Photochem. Photobiol.* **1991**, *54*, 923-928.
39. Cumpston, B. H., Ananthavel, S. P, Barlow, S., Dyer, D. L., Ehrlich, J. E., Erskine, L., Heikal, A., Kuebler, S. M., Lee, I.-Y. S., McCord-Maughton, D., Qin, J., Röckel, H., Rumi, M., Wu, X.-L., Marder, S. R, Perry, J. W. Two-photon polymerization initiators

- for three-dimensional optical data storage and microfabrication. *Nature* **1999**, 398, 51-54.
40. Kawata, S., Kawata, Y. Three-dimensional optical data storage using photochromic materials. *Chem. Rev.* **2000**, 100, 1777-1778.
  41. Masthay, M. B., Sammeth, D. M., Helvenston, M. C., Buckman, C. B., Li, W., CdeBaca, M. J., Kofron, J. T. The laser-induced blue state of bacteriorhodopsin: mechanistic and color regulatory roles of protein-protein interactions, protein-lipid interactions, and metal ions. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 3418-3430.
  42. Krebs, M. P., Isenbarger, T. A. Structural Determinants of Purple Membrane Assembly. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, 1460, 15-26.
  43. Grigorieff, N., Ceska, T. A., Downing, K. H., Baldwin, J. M., Henderson, R. Electron-crystallographic refinement of the structure of bacteriorhodopsin. *J. Mol. Biol.* **1996**, 259, 393-421.
  44. Kimura, Y., Vassilyev, D. G., Miyazawa, A., Kidera, A., Matsushima, M., Mitsuoka, K., Murata, K., Hirai, T., Fujiyoshi, Y. Surface of bacteriorhodopsin revealed by high-resolution electron crystallography. *Nature* **1997**, 389, 206-211.
  45. Essen, L.-O., Siebert, R., Lehmann, W. D., Oesterhelt, D. Lipid patches in membrane protein oligomers: crystal structure of the bacteriorhodopsin-lipid complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1998**, 95, 11673-11678.
  46. Luecke, H., Schobert, B., Richter, H.-T., Cartailler, J.-P., Lanyi, J. Structure of bacteriorhodopsin at 1.55 Å resolutions. *J. Mol. Biol.* **1999**, 291, 899-911.
  47. Sass, H. J., Büldt, G., Gessenich, R., Hehn, D., Neff, D., Schlesinger, R., Berendzen, J., Ormos, P. Structural alterations for proton translocation in the M state of wild-type bacteriorhodopsin. *Nature* **2000**, 406, 649-653.
  48. Subramaniam, S.; Henderson, R. Molecular mechanism of vectorial proton translocation by bacteriorhodopsin. *Nature* **2000**, 406, 653-657.
  49. Sapra, K. T., Hüseyin, B., Oesterhelt, D., Müller, D. J. Characterizing molecular interactions in different bacteriorhodopsin assemblies by single-molecule force spectroscopy. *J. Mol. Biol.* **2006**, 355, 640-650.
  50. Lindahl, M., Henderson, R. Structure of the bacteriorhodopsinD85N/D96N double mutant showing substantial structural changes and a highly twinned disordered lattice. *Ultramicroscopy* **1997**, 70, 95-106.
  51. Möller, C., Büldt, G., Dencher, N. A., Engel, A., Müller, D. J. Reversible loss of crystallinity on photobleaching purple membrane in the presence of hydroxylamine. *J. Mol. Biol.* **2000**, 301, 869-879.
  52. Woese, C. R., Archaeobacteria. *Sci. Am.* **1981**, 244, 98-122.

53. Wagner, G., Halobakterien: Vordringen in biotische Grenzbereiche. *Biol. unserer Zeit* **1979**, 9, 171-179.
54. Houjou, H., Inoue, Y., Sakuai, M. Physical Origin of the Opsin Shift of Bacteriorhodopsin. Comprehensive Analysis Based on Medium Effect Theory of Absorption Spectra. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 4459-4470.
55. Lücke, H., Schobert, Richter, B., H.-T., Cartailier, J.-P., Lanyi, J. K. Structural changes in bacteriorhodopsin during ion transport at 2 Ångström resolutions. *Science* **1999**, 286, 255-260.
56. Houjou, H., Koyama, K., Wada, M., Sameshima, K., Inoue, Y., Sakurai, M. Effects of the protein electrostatic environment on the absorption maximum of bacteriorhodopsin. *Chem. Phys. Let.* **1998**, 294, 162-166.
57. Varo, G., Lanyi, J. K. Pathways of the rise and decay of the M photointermediate(s) of bacteriorhodopsin. *Biochemistry* **1990**, 29, 2241-2250.
58. Tittor, J., Schweiger, U., Oesterhelt, D., Bamberg, E. Inversion of proton translocation in bacteriorhodopsin mutants D85N, D85T, and D85,96N. *Biophys. J.* **1994**, 67, 1682-1690.
59. Sasaki, J., Brown, L. S., Chon, Y.-S., Kandori, H., Maeda, A., Needleman, R., Lanyi, J. K. Conversion of Bacteriorhodopsin into a Chloride Ion Pump. *Science* **1995**, 269, 73-75.
60. Marti, T., Rosselet, S. J., Otto, H., Heyn, M. P., Khorana, H. G. The retinylidene Schiffbase counterion in bacteriorhodopsin. *J. Biochem.* **1991**, 266, 18674-18683.
61. Turner, G. J, Miercke, L. J. W., Thorgeirsson, T. E., Kliger, D. S., Betlach, M. C., Stroud, R. M. Bacteriorhodopsin D85N: Three spectroscopic species in equilibrium. *Biochemistry*. **1993**, 32, 1332-1337.
62. Rhinow, D., Chizhik, I., Baumann, R.-P., Noll, F., Hampp, N. Crystallinity of Purple Membranes Comprising the Chloride-Pumping Bacteriorhodopsin Variant D85T and Its Modulation by pH and Salinity. *J. Phys. Chem. B.* **2010**, 114, 15424-15428.
63. Wu, A., Jia, Z., Schaper, A., Noll, F., Hampp, N. Simultaneous Removal of Thiolated Membrane Proteins Resulting in Nanostructured Lipid Layers. *Langmuir* **2006**, 22, 5213-5216.
64. Miller, A., Oesterhelt, D. Kinetic optimisation of bacteriorhodopsin by aspartic acid 96 as an internal proton donor. *Biochim. Biophys. Acta* **1990**, 1020, 57-64.
65. Tittor, J., Oesterhelt, D., Bamberg, E. Bacteriorhodopsin mutants D85N, D85T and D85, 96N as proton pumps. *Biophys. Chem.* **1995**, 56, 153-157.

66. Tittor, J., Haupts, U., Haupts, C., Oesterhelt, D., Becker, A., Bamberg, E. Chloride and Proton Transport in Bacteriorhodopsin Mutant D85T: Different Modes of Ion Translocation in a Retinal Protein, *J. Mol. Biol.* **1997**, 271, 405-416.
67. Essen, L. O., Siegert, R., Lehmann, W. D., Oesterhelt, D. Lipid patches in membrane protein oligomers: Crystal structure of bacteriorhodopsin bases on high-resolution electron cryomicroscopy. *J. Mol. Bio.* **1990**, 213, 899-929.
68. Worcester, D. L., Miller, R. G., Bryant, P. J. Atomic force microscopy of purple membranes. *J. Microsc.* **1988**, 152, 817-821.
69. Henderson, R., Unwin, P. N. T., Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy. *Nature* **1975**, 257, 28-32.
70. Blaurock, A. E., Stoeckenius, W., Structure of the purple membrane. *Nature, New Biol.* **1971**, 233, 152-155.
71. Shen, Y., Safinya, C. R., Liang, K. S., Ruppert, A. F., Rothschild, K. J., Stabilization of the membrane protein bacteriorhodopsin to 140 °C in two-dimensional films. *Nature* **1993**, 366, 48-50.
72. Mitaku, S., Ikuta, K., Itoh, H., Kataoka, R., Naka, M., Yamada, M., Suwa, M., Denaturation of bacteriorhodopsin by organic solvents, *Biophys. Chem.* **1988**, 30, 69-79.
73. Brouillette, C. G., Muccio, D. D., Finney, T. K., pH dependence of bacteriorhodopsin thermal unfolding, *Biochemistry* **1987**, 26, 7431-7438.
74. Henderson, R. The Structure of Purple Membrane of *Halobacterium halobium*: Analysis of X-ray diffraction Pattern. *J. Mol. Biol.* **1975**, 93, 123-138.
75. Luecke, H., Richter, H.-T., Lanyi, J. K., Proton Transfer Pathways in Bacteriorhodopsin at 2.3 Angstrom Resolution, *Science* **1998**, 280, 1934-1937.
76. Henderson R., Shotton, D. Crystallization of Purple Membrane in Three Dimensions. *J. Mol. Biol.* **1980**, 139, 99-109.
77. Oesterhelt, D., Stoeckenius, W. Isolation of the cell membrane of *Halobacterium halobium* and its fractionation into red and purple membrane. *Methods Enzymol.* **1974**, 31, 667-678.
78. Kirchberg, S., Photoinduzierte Schichtdickenmodifikation von Bakteriorhodopsinfilmen, *Diplomarbeit*, Philipps-Universität Marburg, **2007**.
79. Rhinow, D., Imhof, M., Chizhik, I., Baumann, R.-P., Hampp N. Crystallinity of Purple Membranes Comprising the Chloride-Pumping Bacteriorhodopsin Variant D85T and Its Modulation by pH and Salinity *J. Phys. Chem. B.* **2012**, 116, 7455-7462.
80. Blaurock, A. E., Bacteriorhodopsin: A Trans-membrane Pump Containing  $\alpha$ -helix, *J. Mol. Biol.* **1975**, 93, 139-158.

81. Jähnert, S., Vaca Chávez, F., Schaumann, G. E., Schreiber, A., Schönhoff, M., Findenegg, G. H. Melting and freezing of water in cylindrical silica nanopores. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2008**, *10*, 6039-6051.
82. Wolfe, J., Bryant, G., Koster, K. L. What is 'Unfreezable Water', How Unfreezable is it and How Much is There? *CryoLetters*, **2002**, *23*, 157-166.
83. Kiselev, M. A., Lesieur, P., Kiselev, A. M., Ollivon, M. Ice Formation in Model Biological Membranes in the Presence of Cryoprotectors. *Nucl. Instrum. Meth. Phys. Res. A* **2000**, *448*, 225-260.
84. Weik, M., Lehnert, U., Zaccai, G. Liquid-Like Water Confined in Stacks of Biological Membranes at 200 K and Its Relation to Protein Dynamics. *Biophys. J.* **2005**, *89*, 3639-3646.
85. Wood, K., Plazanet, M., Gabel, F., Kessler, B., Oesterhelt, D., Zaccai, G., Weik, M. Dynamics of hydration water in deuterated purple membranes explored by neutron scattering. *Eur. Biophys. J.* **2008**, *37*, 619-626.
86. Lehnert, U., Réat, V., Weik, M., Zaccai, G., Pfister, C. Thermal Motions in Bacteriorhodopsin at Different Hydration Levels Studied by Neutron Scattering: Correlation with Kinetics and Light-Induced Conformational Changes. *Biophys. J.* **1998**, *75*, 1945-1952.
87. Berntsen, P., Bergman, R., Jansson, H., Weik, M., Swenson, J. Dielectric and Calorimetric Studies of Hydrated Purple Membrane. *Biophys. J.* **2005**, *89*, 3120-3128.
88. Buchsteiner, A., Lechner, R. E., Hauß, T., Dencher, N. A. Relationship Between Structure, Dynamics and Function of Hydrated Purple Membrane Investigated by Neutron Scattering and Dielectric Spectroscopy. *J. Mol. Biol.* **2007**, *371*, 914-923.
89. Lechner, R. E., Fitter, J., Dencher, N. A., Hauß, T. Dehydration of Biological Membranes by Cooling: An Investigation on the Purple Membrane. *J. Mol. Biol.* **1998**, *277*, 593-603.
90. Fitter, J., Lechner, R. E., Dencher, N. A. Interactions of Hydration Water and Biological Membranes Studied by Neutron Scattering. *J. Phys. Chem. B*, **1999**, *103*, 8036-8050.
91. Wood, K., Lehnert, U., Kessler, B., Zaccai, G., Oesterhelt, D. Hydration Dependence of Active Core Fluctuations in BR. *Biophys. J.* **2008**, *95*, 194-202.
92. Michielsen, J. C. F., Dings, J., van der Elsken, J. Small-angle x-ray scattering in the early stages of ice formation. *Phys. Rev. A* **1991**, *44*, 4068-4071.
93. van der Elsken, J., Bras, W. Time dependence of dislocation arrays in ice during recrystallization. *Phys. Rev. B* **1996**, *54*, 3110-3114.

94. Varshney, D. B., Elliott, J. A., Gatlin, L. A., Kumar, S., Suryanarayanan, R., Shalae, E. Y. Synchrotron X-ray Diffraction Investigation of the Anomalous Behavior of Ice During Freezing of Aqueous Systems. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 6177-6182.
95. Sakata, K., Tahara, Y., Morikawa, K., Fujiyoshi, Y., Kimura, Y. A method for observing cross-sectional views of biomembranes. *Ultramicroscopy* **1992**, *45*, 253-261.
96. Dashnau, J. L., Nucci, N. V., Sharp, K. A., Vanderkooi, J. M. Hydrogen Bonding and the Cryoprotective Properties of Glycerol/Water Mixtures. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 13670-13677.
97. Gekkot, K. Timasheff, S. N. Mechanism of Protein Stabilization by Glycerol: Preferential Hydration in Glycerol-Water Mixtures. *Biochemistry* **1981**, *20*, 4667-4676.
98. Towey, J. J., Soper, A. K., Dougan, L. Preference for Isolated Water Molecules in a Concentrated Glycerol-Water Mixture. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 7799-7807.
99. Raymond, J. A. Glycerol is a colligative antifreeze in some northern fishes. *J. Exp. Zool.* **1992**, *262*, 347-352.
100. Zachariassen, K. E.; Kristiansen, E.; Pedersen, S. A.; Hammel, H. T. *Cryobiology* **2004**, *48*, 309.
101. Dorsey, N. E. „Properties of Ordinary Water-Substance“, Publ. Co., New York, **1940**, 184.
102. Chen, Y., Pearlstein, A. J. Viscosity-Temperature Correlation for Glycerol Water Solutions. *Ind. Eng. Chem, Res.* **1987**, *26*, 1670-1672.
103. Cheng N.-S. Formula for the Viscosity of a Glycerol-Water Mixture. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2008**, *47*, 3285-3288.
104. Malomush, N. P., Slinchak, E. L. The cluster structure of dilute aqueous-alcoholic solutions and features of the molecular scattering of light in them. *J. Phys. Chem.* **2007**, *81*, 1983-1988 (in russ.).
105. Draheim, J. E., Cassim, J. Y. Effects of Polyhydric Alcohols on the Conformational Stability of the Purple Membrane. *J. Membrane Biol.* **1985**, *86*, 229-238.
106. Draheim, J. E., Gibson, N. J., Cassim, J. Y. Dehydration-Induced Molecular Structural Changes of Purple Membrane of *Halobacterium Halobium*. *Biophys. J.* **1988**, *54*, 931-944.
107. Gillespie, N. B., Wise, K. J., Ren, L., Stuart, J. A., Marcy, D. L., Hillebrecht, J., Li, Q., Ramos, L., Jordan, K., Fyvie, S., Birge, R. R. Characterization of the Branched -Photocycle Intermediates P and Q of Bacteriorhodopsin. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 13352-13361.



108. Ovchinnikov, Yu. A., Shkrob, A. M., Rodionov, A. V. The Spectral Transition as Indicator of Bacteriorhodopsin State in the Purple Membranes. *Bioorg. Chem.* **1980**, *6*, 1483-1504 (in russ.).
109. Kosar J. Light sensitive systems. J. Wiley & Sons, New York, London, **1965**, 283.
110. Malov, A. N., Neupokoeva, A. V. The holographic recording medium based on dichromated gelatin: supramolecular design and dynamics of the recording. IWWAIU(WI), Irkutsk, **2006**. 345p. (in russ.).
111. Miner Jr., C.S., Dalton, N. N., Glycerol, Reinhold Publ. Co., New York, **1953**, 269.
112. Physical Properties of glycerine and its solutions. Glycerine Producer's Assoc., New York, N. Y.; **1975**, 9.
113. Gopenko, M., Sergeev, N. S. *Kriobiologie* **1983**, *3*, 23-26 (in russ.).
114. Müller, J., Münster, C., Salditt, T. Thermal Denaturing of Bacteriorhodopsin by X-Ray Scattering from Oriented Purple Membranes. *Biophys. J.* **2000**, *78*, 3208-3217.
115. Svergun, D. I., Feigin, L. A. X-Ray and Neutron Small Angle Scattering. Nauka, Moskau, **1984** (in russ.).
116. Defosse, V., Carre, G., Longnof, D. J. Use of a self-developing polymer material for a volume reflection hologram recording. *Pure Appl. Opt.* **1993**, *2*, 437-440.
117. Hermel, H., Soebboth, A. Water-dependent matrix orientation in thin gelatin layers. *Thin Solid Films* **1993**, *223*, 371-374.
118. Gelatine Handbook: Theory and Industrial Practice. Schrieber and R., Gareis, H. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, **2007**, 350.
119. Babel, W. Gelatine - ein vielseitiges Biopolymer. *Chem. unserer Zeit* **1996**, *2*, 86-95.
120. Huang, J. Y., Lewis, A. Determination of the absolute orientation of the retinylidene chromophore in purple membrane by a second-harmonic interference technique. *Biophys. J.* **1989**, *55*, 835-842.
121. Libertino, S., Fichera, M., La Mantia, A., Ricceri, D. Optical and structural characterization of BR films on Si-based materials. *Synthetic Metals* **2003**, *138*, 141-144.
122. R. Li, F. Hu, Q. Bao, S. Bao, Y. Qiao, S. Yu, Li, J. G. C. M. Enhancement of photoelectric response of bacteriorhodopsin by multilayered WO<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>O nanocrystals/PVA membrane. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 689-691.
123. Tallent, J. R., Stuart, J. A., Song, Q. W., Schmidt, E. J., Martin, C. H., Birge, R. R. Photochemistry in Dried Polymer Films Incorporating the Deionized Blue Membrane Form of Bacteriorhodopsin. *Biophys. J.* **1998**, *75*, 1619-1634.
124. Uehara, K., Kawai, K. Photoelectric response of oriented purple membrane electro-deposited onto poly(vinyl alcohol) film. *Thin Solid Films* **1993**, *232*, 271-277.

125. Huang, J. Y., Chen, Z., Lewis, A. Second-Harmonic Generation in Purple Membrane-Poly(vinyl alcohol) Films: Probing the Dipolar Characteristics of the Bacteriorhodopsin Chromophore in bR<sub>570</sub> and M<sub>412</sub>. *J. Phys. Chem.* **1989**, 93, 3314-3320.
126. Bryll, K., Vard, G., Drabent, R. The photocycle of bacteriorhodopsin immobilized in poly(vinyl alcohol) film. *FEBS Lett.* **1991**, 285, 66-70.
127. Zhang, L., Zeng, T., Cooper, K., Claus, R. O. High-Performance Photovoltaic Behavior of Oriented PM Polymer Composite Films. *Biophys. J.* **2003**, 84, 2502-2507.
128. Pandey, P. C., Pandey, D., Singh, R. Extraction and Purification of Purple Membrane for Photochromic Thin Film Development: Application in Photoelectrochemical Investigation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2012**, 168, 936-946.
129. Tallent, J., Song, Q. W., Li, Z., Stuart, J., Birge, R. R. Effective photochromic nonlinearity of dried blue-membrane bacteriorhodopsin films. *Opt. Lett.* **1996**, 21, 1339-1341.
130. Borissevitch, G. P., Lukashev, E. P., Kononenko, A. A., Rubin, A. B. Electric Field Effects on Spectral Characteristics and Phototransformations of bR in Self-Assembled Films. *Brazil. J. Phys.* **1997**, 27, 1-10.
131. Khodonova, A. A., Demina, O. V., Khitrina, L. V., Kaulen, A. D., Silfsten, P., Parkkinen, S., Parkkinen, J., Jaaskelainen, T. Modified bacteriorhodopsins as a basis for new optical devices. *Sens. Actuat. B* **1997**, 38-39, 218-221.
132. Guo-qing, T., Zheng-shan, Y., Gui-lan, Z., Wen-ju, C. Temporary response of phase conjugation wave and grating properties in BR-PVA film in DFWM field. *Acta Physica Sinica* **1996**, 45, 966-976.
133. Frydrych, M., Lensu, L., Parkkinen, S., Jaaskelainen, T. Photoelectric Response of BR in Thin PVA. Films and Its Model. In: Brain, Vision, and Artificial Intelligence: First International Symposium, BVAI **2005**, Neapel, Massimo De Gregorio, Maria Frucci, Vito Di Maio und Carlo Musio (Hrsg.), Springer-Verlag, 126-136.
134. Hampp, N., Seitz, A. Verfahren und Zubereitung zur photochromen Markierung und/oder Sicherung der Authentizität von Gegenständen. Patent EP 1171309A1 **2003**.
135. Zhang, L., Zeng, T., Claus, R. O., Cooper, K. L. Orientationally Enhanced Photocurrent and Electrooptic Modulation Effects in Bacteriorhodopsin/Polyvinyl Alcohol Thin Films. *J. Phys. Chem. B* **2002**, 106, 2996-3000.
136. Mohammadi, S., Molaeirad, A., Etemadzadeh, A. Bacteriorhodopsin Based Films as a Nanomemory. *Adv. Studies Biol.* **2012**, 4, 207 - 216.
137. Tittor, J., Oesterhelt, D., Bamberg, E. Bacteriorhodopsin mutants D85N, D85T and D85,96N as proton pumps. *Biophys. Chem.* **1995**, 56, 153-157.

138. Brown, L., Kamikubo, H., Zimányi, L., Kataoka, M., Tokunaga, F., Verdegem, P., Lugtenburg, J., Lanyi, J. K. A local electrostatic change is the cause of the large-scale protein conformation shift in bacteriorhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1997**, *94*, 5040-5044.
139. Rhinow, D., Hampp, N. A. Light- and pH-dependent conformational changes in protein structure induce strong bending of purple membranes -active membranes studied by cryo-SEM. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 13116-13120.
140. Baumann, R.-P., Schranz, M., Hampp, N. Bending of purple membranes in dependence on the pH analyzed by AFM and single molecule force spectroscopy. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 4329-4335.
141. Rhinow, D., Hampp, N. Curvature of Purple Membranes Comprising Permanently Wedge-Shaped Bacteriorhodopsin Molecules Is Regulated by Lipid Content. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 549-556.
142. Rouhani, S., Cartailier, J. P., Facciotti, M. T., Walian, P., Needleman, R., Lanyi, J. K., Glaeser, R. M., Luecke, H. Crystal structure of the D85S mutant of bacteriorhodopsin: Model of an O-like photocycle intermediate. *J. Mol. Biol.* **2001**, *313*, 615-621.
143. Facciotti, M. T., Cheung, V. S., Nguyen, D., Rouhani, S., Glaeser, R. M. Crystal structure of the bromide-bound D85S mutant of bacteriorhodopsin: Principles of ion pumping. *Biophys. J.* **2003**, *85*, 451-458.
144. Heymann, J. A. W., Havelka, W. A., Oesterhelt, D. Homologous over expression of a light-driven anion pump in an archaebacterium. *Mol. Microbiol.* **1993**, *7*, 623-630.
145. Havelka, W. A., Henderson, R., Heymann, J. A. W., Oesterhelt, D. Projection structure of halorhodopsin from *Halobacterium halobium* at 6 Å resolution obtained from electron cryo-microscopy. *J. Mol. Biol.* **1993**, *234*, 837-845.
146. Persike, N., Pfeiffer, M., Guckenberger, R., Radmacher, M., Fritz, M. Direct observation of different surface structures on high-resolution images of native halorhodopsin. *J. Mol. Biol.* **2001**, *310*, 773-780.
147. Neebe, M., Rhinow, D., Schromczyk, N., Hampp, N. A. Thermochromism of Bacteriorhodopsin and Its pH Dependence. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 6946-6951.
148. Lazarev, Yu. A., Shnyrov, V. L. A Study of Heat Denaturation of Bacteriorhodopsin from *Halobacterium halobium*. *Bioorg. Chem.* **1979**, *5*, 105-112 (in russ.).
149. Shnyrov, V. L. Calorimetric Investigation of the NaBH<sub>4</sub>-Modified Bacteriorhodopsin in Purple Membrane from *Halobacterium halobium*. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **1994**, *34*, 281-286.
150. Jackson, M. B., Sturtevant, J. M. Phase Transitions of the Purple Membranes of *Halobacterium halobium*. *Biochem.* **1978**, *17*, 911-915.

## 8. Danksagung

Ich möchte Herrn Prof. Dr. Hampp für die Möglichkeit danken, meine Doktorarbeit in den Bereichen Biophysik und Physikalischen Chemie in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen, sowie für die Themenstellung, das freie Arbeitsumfeld, die Unterstützung und das Vertrauen, das mir entgegengebracht wurde. Das sehr interessante Thema meiner Arbeit und die damit verbundenen vielfältigen wissenschaftlichen Fragestellungen erlaubten es mir, für mich neue physikalische Methoden und Konzepte bei der Herstellung von Proben zu kombinieren und dabei meine wissenschaftlichen Erfahrungen grundlegend zu erweitern.

Herrn Prof. Dr. W.-C. Pilgrim möchte ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens und für stets angenehme Arbeitsatmosphäre innerhalb seiner AG danken.

Besonders möchte ich mich auch bei Dr. Frank Noll bedanken für interessante Zusammenarbeit und für seine ständige Hilfsbereitschaft, insbesondere für Tipps und Ratschläge rund um die Literatursuche und für die große Hilfe in deutscher Sprache.

Des Weiteren bedanke ich mich für die angenehme Zusammenarbeit mit Martin Imhof sowie für die erfolgreiche wissenschaftliche Kooperation und interessanten Diskussionen mit Dr. Daniel Rhinow am MPI für Biophysik (Frankfurt/Main).

Ein weiterer Dank gebührt

meinen Arbeitskollegen: Nina Schneider, Annegret Busch, Jutta Hennen, Pierre Hillebrecht, Dr. Hee-Cheol Kim, Hendrik Reinhardt, Philipp Behrendt, Simon Helmstetter, Fang Yang, Philipp Kahler und Alexander Müller für stets angenehme und offene Arbeitsatmosphäre innerhalb AG,

Dr. Andreas Schaper und Michael Hellwig für die technische Unterstützung bei SEM- und TEM-Messungen und ihre Hilfe bei der Interpretation der SEM-Aufnahmen

und den Mitarbeitern der Feinmechanik- und Elektronikwerkstatt für ihre Hilfe.

Letztendlich möchte ich mich auch bei meinem Sohn Petr bedanken, der mich während der Promotion gefördert und begleitet hat.